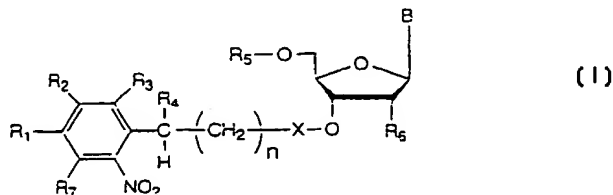



 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07H 19/06, 19/16, C12Q 1/68		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/61594
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Oktober 2000 (19.10.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01148 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. April 2000 (07.04.00) (30) Prioritätsdaten: 199 15 867.3 8. April 1999 (08.04.99) DE 100 03 631.7 28. Januar 2000 (28.01.00) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BEIER, Markus [DE/DE]; Werderstrasse 42a, D-69120 Heidelberg (DE). HOHEISEL, Jörg [DE/DE]; Richard-Wagner-Strasse 2, D-69168 Wies- loch (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringerstrasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.	

(54) Title: NUCLEOSIDE DERIVATIVES WITH PHOTO-UNSTABLE PROTECTIVE GROUPS

(54) Bezeichnung: NUCLEOSID-DERIVATE MIT PHOTOLABILEN SCHUTZGRUPPEN



(57) Abstract

The present invention relates to nucleoside derivatives with photo-unstable protective groups of general formula (I). The invention further relates to a method for producing said nucleosides, the use thereof and nucleic acid chips consisting thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen der allgemeinen Formel (I). Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung dieser Nucleoside, deren Verwendung und daraus aufgebaute Nucleinsäure-Chips.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen, Verfahren zu deren Herstellung, deren Verwendung sowie daraus aufgebaute Nucleinsäure-Chips.

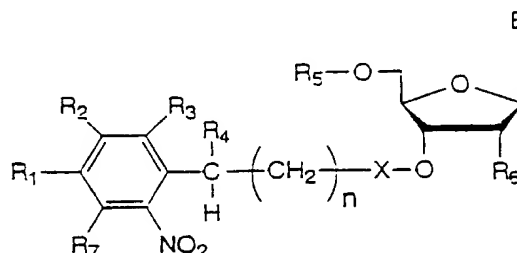
Photolabile Schutzgruppen für die Hydroxy- und Phosphatfunktionen in Nucleosiden bzw. Nucleotiden sind von Bedeutung, da sie sich für die lichtgesteuerte Parallel-Synthese von Oligonukleotiden auf einer soliden Trägeroberfläche eignen (Fodor et al., Science 1991, 251, S. 767 ff.). Hiermit können Oligonukleotide oder Nukleinsäure-Chips aufgebaut werden, die z.B. für eine effiziente Sequenzierung von Nukleinsäuren eingesetzt werden können.

Bislang sind einzig photolithografische Herstellungsverfahren von DNA-Chips unter Verwendung von 3'-O-Phosphitamiden, die entsprechend die temporäre photolabile Schutzgruppe an der 5'-O-Position aufweisen, bekannt (WO-A-96/18634). Unter Verwendung dieser Nucleinsäurebausteine lassen sich DNA-Chips herstellen, wobei der Aufbau des Oligomers vom 3'- zum 5'-Ende erfolgt. Das fertiggestellte Oligomer ist somit über das 3'-O-Ende an der festen Phase verankert, das 5'-OH-Ende ist frei zugänglich. DNA-Chips, die mit dieser Methode erzeugt wurden, lassen sich für Hybridisierungsexperimente verwenden, aber nicht für bestimmte Enzymreaktionen (z.B. mit der DNA-Polymerase oder Ligase), die ein freies 3'-OH erfordern.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, 3'-photolabile Nucleoside und deren Derivate bereitzustellen und mit den daraus gewonnenen 3'-photolabilen Nucleosiden Nukleinsäure-Chips zu generieren, bei denen die über die lichtgesteuerte Synthese aufgebauten Oligomeren über das 5'-Ende an die feste Phase gekoppelt sind und somit Enzymreaktionen am 3'-Ende möglich machen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Nucleosid-Derivate der allgemeinen Formel (I) entsprechend Patentanspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Erfindungsgemäße Nucleosid-Derivate haben folgende Formel:



mit

R^1 = H, NO_2 , CN, OCH_3 , Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen

R^2 = H, NO_2 , CN, OCH_3 , Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,

R^3 = H, Halogen, NO_2 , CN, OCH_3 , Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,

R^4 = H, Halogen, NO_2 , CN, OCH_3 , Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,

R^5 = H, Dimethoxytrityl oder eine in der Nucleotidchemie übliche Schutzgruppe oder eine übliche funktionelle Gruppe zur Herstellung von Oligonukleotiden übliche Schutzgruppe

R^6 = H, OH, Halogen oder ΨR^8 , wobei Ψ = O oder S und R^8 = Alkyl- oder Alkoxyalkyl mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphati-

scher Acylrest mit 2 bis 5 Atomen sowie eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe

R^7 = H, NO_2 , CN, OCH_3 , Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,

n = 0 oder 1

X = SO_2 , OCO, OCS

B = H, Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil, 2,6-Diaminopurin-9-yl, Hypoxanthin-9-yl, 5-Methylcytosin-1-yl, 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäure-1-yl oder 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäureamid-3-yl, wobei im Falle von B = Adenin, Cytosin oder Guanin die primäre Aminofunktion ggf. eine temporäre oder permanente Schutzgruppe aufweist bzw. Thymin oder Uracil an der O4-Position ggf. eine permanente Schutzgruppe aufweist.

Die Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylgruppe der Reste R^1 , R^2 , R^3 , R^4 und R^7 kann linear oder verzweigt sein, substituiert (insbesondere mit einem oder mehreren Halogenatomen) oder unsubstituiert sowie gesättigt oder ungesättigt sein. Zwischen den Resten kann eine Brückenverbindung bestehen, z.B. über eine Methylengruppe, so daß sich eine weitere Ringfunktion ergibt. Analoges gilt für die Axyl- oder Arylgruppe der Reste R^2 , R^3 , R^4 oder R^7 . Hier kommen als Substituenten neben Halogenatomen auch Alkylgruppen in Frage. Bevorzugte Alkylreste sind Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, n-Butyl-, iso-Propyl, tert-Butyl-. Bevorzugte Alkoxyreste sind die Methoxy-, Ethoxy- oder tert-Butoxygruppierung. Bevorzugte aliphatische Acylreste sind der Formylrest ($-\text{CHO}$), Acetylrest ($-\text{CO}-\text{CH}_3$), Propionylrest ($-\text{CO}-\text{C}_2\text{H}_5$) oder Butyrylrest ($-\text{CO}-\text{C}_3\text{H}_7$). Bevorzugte (Hetero)Arylreste sind der Phenyl-, Thienyl-, Thiophenyl-, Furyl-, Furanyl-, Pyranyl-, Pyrrolyl-, Imidazolyl-, Pyrazolyl-, Pyridyl-, Pyrazinyl-, Pyrimidinyl-, Pyrazinyl-, Pyridazinyl-, Thiazolyl-, Oxazolyl-, Indolyl-, Pyrrolinyl-, Imidazolinyl-, Pyrazolinyl-, Thiazolinyl-, Triazolyl-, Tetrazolylgruppe sowie sich daraus ergebende annellierte Ringe.

Vorzugsweise stellt R^4 H oder einen Methylrest dar. Im Falle von $R^4 \neq H$ sind die Substituenten $R^1 - R^3$ am Phenylring vorzugsweise Wasserstoffreste. Außerdem stellt im Falle von $R^2 = OCH_3$, R^3 vorzugsweise einen Wasserstoffrest dar.

In der Position R^5 bedeutet "eine bei der Herstellung von Oligonukleotiden übliche Schutzgruppe" beispielsweise eine Phosphitamid-Gruppe, wie $p\text{-NC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$, $p\text{-NC-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$, $p\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$ oder $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$, wobei die Q-Gruppen gleich oder verschieden sein können und lineare oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 4 C-Atomen, vorzugsweise Ethyl- oder Isopropylreste, bedeuten.

In der Position R^6 bedeutet "eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe" ($=R^8$) insbesondere H sowie die üblichen O-Alkyl-, O-Alkenyl-, O-Acetal- oder O-Silylether-Schutzgruppen. Bevorzugte Schutzgruppen sind O-Methyl- oder O-Ethylreste, O-Allylreste, O-Tetrahydropyran-yl- bzw. O-Methoxytetrahydropyran-yl-Reste sowie O-t-Butyldimethylsilyl-Reste.

Die an den Basen B ggf. permanent vorkommenden Schutzgruppen basieren vorzugsweise auf Acyl-Schutzgruppen. Bevorzugt sind vor allem Phenoxycetyl-, tert-Butylphenoxycetyl-, Isobutyryl-, Acetyl-, Benzoyl-, Allyloxycarbonyl-, Phthaloyl-, Dansylethoxycarbonyl-, 2-(4-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl- oder Dimethylformamidino-Reste. Im Falle von Adenin, Cytosin und Guanin handelt es sich vorzugsweise um Phenoxycetyl-, tert-Butylphenoxycetyl-, Acetyl- oder 2-(4-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-Gruppen zum Schutz der exocyclischen Aminofunktionen. Die O^6 -Position von Guanin kann ggf. durch eine Schutzgruppe wie 2-(4-Nitrophenylsulfonyl)ethyl- oder 2-(4-Nitrophenyl)ethyl- geschützt sein. Ebenso kann die O^4 -Position von Thymin oder Uracil eine Schutzgruppe wie 2-(4-Nitrophenylsulfonyl)ethyl- oder 2-(4-Nitrophenyl)ethyl- aufweisen.

Halogen bedeutet erfindungsgemäß F, Cl, Br, I, wobei die drei letztgenannten bevorzugt sind.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Nucleosid-Derivate ist beispielhaft in Fig. 2 gezeigt, worauf nachfolgend Bezug genommen wird. Die Erwähnung von bestimmten Halogen- und Alkylsubstitutionen schließt immer gleichwirkende Äquivalente ein, z.B. "Chlor-" schließt nicht aus, daß auch die entsprechenden Iod- oder Bromverbindungen einsetzbar sind. Eben solches gilt für "Methyl-", das auch die entsprechenden anderen Niederalkylverbindungen, wie Ethyl-, Propyl- oder Butyl mit einschließt. Die Reste R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^6 , R^7 und X haben die oben genannten Bedeutungen.

Die Herstellung beginnt mit der Präparation eines Acylierungsreagenzes. Hierzu wird auf Fig. 1 verwiesen. Ausgegangen wird hierfür bevorzugt von einem Chlorkohlensäureester (II, mit $X = OCO$), der sich beispielsweise gemäß der Vorschrift in WO-A-96/18634 oder gemäß nachfolgendem Beispiel 1 erhalten läßt. Analog ist ein gewünschter Chlorthiokohlensäureester (II, mit $X = OCS$) über die analoge Umsetzung mit Thiophosgen zugänglich. Das Acylierungsreagenz (IV) wird dann durch Umsetzung des Chlorkohlensäureesters (II, mit $X = OCO$) oder des Chlorthiokohlensäureesters (II, mit $X = OCS$) oder eines entsprechenden Sulfonylchlorid-Derivats (II, $X = SO_2$) mit einer Verbindung (III), vorzugsweise N-Methylimidazol, generiert. Diese Reaktionen werden in einem polaren organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Dichlormethan, bei Temperaturen zwischen $-10^\circ C$ und $+10^\circ C$, vorzugsweise bei $0^\circ C$, durchgeführt. Vorzugsweise wird der Reaktion Molekularsieb zugesetzt und mit einem Überschuß an Verbindung (III), bevorzugt N-Methylimidazol, in bezug auf die eingesetzte Verbindung (II) gearbeitet: 1-10 Äquivalente, bevorzugt 2-5 Äquivalente. Alternativ zu N-Methylimidazol kann die Generation des Acylierungsreagenzes auch mittels anderer heterocyclischer Verbindungen (III), wie Pyridin, 4-N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP), Triazol, Tetrazol oder Imidazol verlaufen.

Alternativ ist das Acylierungsreagenz (IV, $Z = \text{triflat}$) ausgehend von N,N-Carbonyldiimidazol (V, $Y = CO$) oder N,N-Thiocar-

bonyldiimidazol (V, Y = CS) nach Methylierung mit einem Methylierungsreagenz (VI), vorzugsweise Trifluormethansulfonsäuremethylester, und Umsetzung mit dem entsprechenden Alkohol (VIII) zugänglich. Hierbei wird die Reaktion bevorzugt in einem polaren organischen Lösungsmittel, vorzugsweise in Nitromethan oder einem Gemisch von Nitromethan und Dichlormethan, bei Temperaturen zwischen -10 und $+10^{\circ}\text{C}$, vorzugsweise 0°C , durchgeführt. Die Methylierung von (V) erfolgt beispielsweise gemäß Rapoport et al., J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, S. 4856-4859. Nach erfolgter Methylierung wird der entsprechende Alkohol (VIII) zugesetzt und somit das Acylierungsmittel vom Imidazoliumtyp (IV, Z = triflat) in Form eines Triflatsalzes generiert. Werden bei der Methylierung von (V) als Methylierungsreagenz (VI) Methyljodid oder Meerweinsalze eingesetzt, können die Acylierungsreagenzien (IV) entsprechend in Form ihrer Iodid oder Tetrafluoroborat-Salze erzeugt werden. Die Umsetzung von Verbindung (V) mit dem entsprechenden Methylierungsmittel erfolgt vorzugsweise im Verhältnis 1:1 bis 1:10, bevorzugt im Verhältnis 1:2. Die Umsetzung der methylierten Form (VI) mit dem entsprechenden Alkohol (VIII) erfolgt vorzugsweise im Verhältnis 1:1 bis 1:10, ganz bevorzugt im Verhältnis 1:1 bis 1:2.

Das Acylierungsreagenz (IV) wird weiter mit einem ggf. geschützten Nucleosid (IX) umgesetzt. 5'-DMTr-geschützte Nucleoside der allgemeinen Formel (IX) sind beispielsweise käuflich erhältlich von den Firmen Prologo, Fluka, Sigma oder Aldrich.

Die Umsetzung des Acylierungsreagenz (IV) mit den geschützten Nucleosiden (IX) erfolgt vorzugsweise in Dichlormethan oder einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und einem polaren organischen Lösungsmittel ggf. in Gegenwart einer Base, wie Pyridin, N-Methylimidazol, 4,N,N-Dimethylaminopyridin, Ethyldiisopropylamin ($\text{EtN}(\text{i-pr})_2$) oder Triethylamin, bei Temperaturen zwischen -60 und $+25^{\circ}\text{C}$, bevorzugt 0°C . Als polares organisches Lösungsmittel wird vorzugsweise Dichlorethan, Nitromethan, DMF oder Pyridin eingesetzt. Das Mischungsverhältnis

von Dichlormethan zu dem polaren organischen Lösungsmittel unterliegt keiner Beschränkung. Vorzugsweise werden jedoch 1 bis 3 Vol.-Teile Dichlormethan pro Vol.-Teil polarem organischen Lösungsmittel eingesetzt. Bevorzugt wird eine Lösung des Acylierungsreagenz (IV) in Dichlormethan vorgelegt und das Nucleosid (IX), welches ebenso in Dichlormethan gelöst wurde, zugetropft. Das Molverhältnis von Acylierungsreagenz zu Nucleosid kann vorzugsweise zwischen 1:1 bis 5:1, bevorzugt bei 3:1, ganz bevorzugt bei 2:1 liegen, d.h. das Acylierungsreagenz wird bevorzugt im Überschuß verwendet. Die Konzentration des Nucleosids im Lösungsmittelgemisch unterliegt keiner Beschränkung. Sie liegt jedoch bevorzugt im Bereich von 0,1 bis 3,0 mmol pro 10 ml Lösungsmittel.

Nach erfolgter Umsetzung (bevorzugte Reaktionszeit: 1-12 Std.) kann das erhaltene Nucleosid-Derivat (X) isoliert werden. Danach erfolgt das Abspalten der 5'-Schutzgruppe am Nucleosidbestandteil durch Umsetzen mit bevorzugt Trichloressigsäure oder Toluolsulfonsäure, ggf. mit Camphersulfonsäure oder Dichloressigsäure in Dichlormethan. Es wird das Nucleosid-Derivat (XI) erhalten, das Formel (I) gehorcht.

Falls es gewünscht ist, kann an der 5'-Position des Nucleosid-Derivats (XI) eine Phosphitamid-Gruppe eingeführt werden. Dies geschieht beispielsweise durch die Umsetzung des Nucleosid-Derivats (XI) mit Bis(diisopropylamino)(β -cyanoethoxy)phosphin unter Zusatz eines leicht aciden Katalysators (beispielsweise Tetrazol, Pyridin-Hydrochlorid) oder durch Umsetzung des Nucleosidderivats mit Chlor-Diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphin unter Zusatz einer Base (z.B. Diisopropylethylamin, N-Methylmorphin, Lutidin oder Collidin) und einem Lösungsmittel (z.B. THF, Dichlormethan). Dabei entsteht Verbindung (XII).

Der Vorteil die Umsetzung des geschützten Nucleosids mit einem milden Acylierungsreagenz durchzuführen, liegt in der Selektivität der Reaktion. Es werden quantitative Acylierungen der 3'-O-Position des Nucleosidbausteins ohne nachteilige Neben-

produktformation erhalten. Werden hierzu reaktivere Acylierungsreagenzien, wie z.B. der entsprechende Chlorkohlensäureester selbst, verwendet, tritt eine unkontrollierte Reaktion ein. Es werden eine große Anzahl von Nebenprodukten gebildet, d.h. es besteht hierbei keinerlei Selektivität für das gewünschte 3-monoacylierte Produkt. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform wird das geschützte Nucleosid mit dem Acylierungsreagenz unter Zusatz von Molekularsieb durchgeführt. Mit Molekularsieb ist eine Steigerung der Selektivität für das gewünschte 3'-monoacylierte Produkt zu beobachten.

Die erfindungsgemäßen 3'-photolabilen Nucleoside können bei der photolithografischen Nukleinsäurechip-Synthese eingesetzt werden. Verfahren hierzu sind dem Fachmann ausreichend bekannt (z.B. Fodor et al., s.o). Ein geeignetes Verfahren hierzu ist beispielsweise auch in der deutschen Anmeldung DE 198 58 440.7 gezeigt. Dort wird zwar ein Verfahren gezeigt, das von 5'-photolabilen Nucleosiden ausgeht, aber die dort gezeigte Methodik läßt sich auf die Verwendung von 3'-photolabilen 5'-Phosphitamiden (gemäß Formel XII von Fig. 2) analog übertragen. Bei diesem Verfahren wird der bei der Chip-Synthese übliche Bestrahlungsschritt in Anwesenheit einer Base durchgeführt wird. Dieses Verfahren zur photolithografischen Biochip-Synthese bietet den Vorteil, daß eine effiziente Abspaltung von photolabilen Schutzgruppen stattfindet.

Unter einem Nucleinsäurechip sollen erfindungsgemäß auf einem Träger aufgebaute Biomoleküle, wie DNA oder RNA, sowie Nucleinsäureanaloga, wie PNA, LNA oder Chimären von diesen mit DNA, RNA oder untereinander verstanden werden.

Erfindungsgemäß ist jegliche(r) auf diesem Gebiet übliche Träger bzw. Matrix bei der Nucleinsäurechip-Herstellung einsetzbar. Dies sind insbesondere Glas, Folien bzw. Membranen aus Polypropylen, Nylon, Cellulose, Cellulosederivate (z.B. Celluloseacetat, Cellulose-Mischester), Polyethersulfonen, Polyamiden, Polyvinylchlorid, Polyvinylidenfluorid, Polyester,

Teflon oder Polyethylen. Die Trägeroberflächen können auch mit freien oder geschützten funktionellen Gruppen versehen sein, z.B. eine Amino-Gruppe, Hydroxyl-Gruppe, Carboxyl-Gruppe, Carbonyl-Gruppe, Thiol-, Amid- oder Phosphat-Gruppe tragen. In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die Trägeroberflächen eine Derivatisierung gemäß der deutschen Patentanmeldung 198 53 242.3 auf.

Bei dem oben genannten bevorzugten Verfahren zur photolithografischen Biochip-Synthese gemäß der deutschen Anmeldung DE 198 58 440.7 werden die Schritte Kondensation, Oxidation und Capping wie üblich (Fodor et al., Science 1991, 251, S. 767 ff.) durchgeführt. Allerdings findet der erste Schritt der Synthese, nämlich die Bestrahlung, unter Zusatz von Basen, bevorzugt starken Basen, insbesondere nicht-nukleophilen Basen, statt, was in Zusammenwirken mit dem bei der Bestrahlung angewendeten Licht zu einer überraschend effektiven Abspaltung der Schutzgruppen führt. Als Basen eignen sich die dem Fachmann bekannten Basen, wie z.B. DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, DBN (1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en, Diisopropylethylamin, Pyridin, Piperidin, Triethylamin, Diisopropylamin, N-Methylmorpholin, 2,6-Lutidin, Collidin, N-Methylimidazol, Dabco, N,N-Dimethylaminopyridin. Die Bestrahlung kann unter den üblichen Bedingungen stattfinden. Die Wellenlänge der Bestrahlung ist von der verwendeten Schutzgruppe abhängig. Die geeigneten Wellenlängen sind dem Fachmann bekannt. Die Menge an während der Bestrahlung anwesender Base variiert zwischen 0,01 M und 1,0 M und ist natürlich von der Basenstärke abhängig. So hat sich es sich bewährt 0,03 bis 1 M (bevorzugt 0,05 bis 0,5 M) DBU in Acetonitril, 0,03 bis 0,8 M (bevorzugt 0,05 M) Diisopropylethylamin in Acetonitril oder 0,03 bis 1 M (bevorzugt 0,05 M) Piperidin in Acetonitril zu verwenden.

Nucleinsäure-Chips, die unter Verwendung erfindungsgemäßer Nucleoside hergestellt worden sind, sind dadurch gekennzeichnet, daß das fertiggestellte Oligomer mit der 5'-Position mit der festen Phase verbunden ist, das 3'-OH aber frei zugänglich

ist (vgl. Fig. 3). DNA-Chips, die mit dieser Methode erzeugt wurden, lassen sich sowohl für Hybridisierungsexperimente als auch für bestimmte Enzymreaktionen (z.B. DNA-Polymerase), die ein freies 3'-OH erfordern, verwenden. Somit haben Nucleinsäure-Chips (bevorzugt DNA-Chips), die mit dieser Strategie erzeugt wurden, einen weit größeren Anwendungsbereich, da mit diesen sowohl alle Experimente durchgeführt werden können wie mit den "üblichen" DNA-Chips, aber darüberhinaus noch hochparallel festphasengestützte Enzymreaktionen (z.B. cDNA-Synthese, Ligase-Reaktionen, reverse Transkription, PCR, multiplex-PCR) durchgeführt werden können. Damit erschließen sich neue Anwendungsgebiete (z.B. DNA-Computing, festphasengestützte Sequenzierung).

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Figuren beschrieben.

- Fig. 1: Herstellung eines Acylierungsreagenzes (allgemein)
- (a) Herstellung des Acylierungsreagenzes für $X = \text{OCO}$
 - (b) Herstellung des Acylierungsreagenzes für $X = \text{OCS}$
 - (c) Herstellung des Acylierungsreagenzes für $X = \text{SO}_2$

Fig. 2: Allgemeiner Synthesepfad erfindungsgemäßer 3'-photolabiler Nucleosid-Derivate

Fig. 3-7: Synthesepfade der Verbindungen gemäß der Beispiele 1-16

Fig. 8: Aufbau eines Oligonukleotids unter Verwendung 3'-O-photolabiler 5'-Phosphitamide gemäß Formel (I)

Fig. 9: Fluoreszenz-Image eines DNA-Chips, der unter Verwendung von 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N,-diisopropylphosphoramidit] hergestellt wurde. Auf der

Trägeroberfläche wurde die Sequenz dT₉ aufgebaut. Das dT₉ - Oligonukleotid ist mit seinem 5'-Ende auf der Oberfläche verankert, das 3'-OH steht für eine Enzymreaktion frei zur Verfügung. Das abgebildete Fluoreszenz-Image wurde nach Hybridisierung des Chips mit Cy5-markiertem dA₁₆ erhalten. Das Muster entspricht der verwendeten Maske.

Fig. 10: Fluoreszenz-Image eines DNA-Chips, der unter Verwendung von 3'-O-[6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl-)N,N,-diisopropylphosphoramidit] hergestellt wurde. Auf der Trägeroberfläche wurde die Sequenz dT₁₀ aufgebaut. Das dT₁₀ - Oligonukleotid ist mit seinem 5'-Ende auf der Oberfläche verankert, das 3'-OH steht für eine Enzymreaktion frei zur Verfügung. Das abgebildete Fluoreszenz-Image wurde nach Hybridisierung des Chips mit Cy5-markiertem dA₁₆ erhalten. Das Muster entspricht der verwendeten Maske.

Fig. 11 zeigt das Fluoreszenz-Image eines DNA-Chips der zur Bestimmung der Bestrahlungszeit für die von 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-Schutzgruppe verwendet wurde. Von links nach rechts wurde mit 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 min ein oberflächengebundener 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-Baustein bestrahlt. Im Anschluss wurde die erfolgte Abstraktion der von 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-Gruppen durch permanentes Labeling mit einem Cy5-Farbstoff sichtbar gemacht. Das Muster entspricht der verwendeten Maske.

Fig. 12 Polymerase-Reaktion auf einem DNA-Chip (Sequenz: dT₉), der unter Verwendung von 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit] hergestellt wurde. Die Polymerase-Reaktion (Primer Extension) wurde mit den abgebildeten Nucleotid-Sequenzen durchgeführt

und deren Erfolg mittels Hybridisierung sichtbar gemacht. Gezeigt sind die Fluoreszenz-Images, die nach gleichzeitiger Hybridisierung mit Cy5-markierten dA_{16} und Cy3-markiertem $d(CTATAGTGAGTCGTA)$ erhalten wurden. Mit Cy5- dA_{16} wird die mittels licht-gesteuerter Synthese auf der Trägeroberfläche erzeugte dT_9 -Sequenz detektiert; mit Cy3- $d(CTATAGTGAGTCGTA)$ wird ausschließlich die Kettenverlängerung des oberflächengebundenen Primers durch die Polymerase-Reaktion detektiert.

Fig. 13 Ligase-Reaktion auf einem DNA-Chip (Sequenz: dT_{10}), der unter Verwendung von 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] hergestellt wurde. Die Ligase-Reaktion wurde mit den abgebildeten Nucleotid-Sequenzen durchgeführt und deren Erfolg mittels Hybridisierung sichtbar gemacht. Gezeigt sind die Fluoreszenz-Images, die nach gleichzeitiger Hybridisierung mit Cy5-markiertem dA_{16} und Cy3-markiertem $d(CTATAGTGAGTCGTA)$ erhalten wurden. Mit Cy5- dA_{16} wird die mittels lichtgesteuerter Synthese auf der Trägeroberfläche erzeugte dT_{10} -Sequenz detektiert; mit Cy3- $d(CTATAGTGAGTCGTA)$ wird ausschliesslich die Anknüpfung der Sequenz $d(5'\text{-Phosphat-AATACGACTCACTA-TAG})$ durch die Ligase-Reaktion detektiert. In der Mitte der Arrays wurde als Negativkontrolle keine Ligasereaktion durchgeführt und daher ist dieser Spot auch nur im Cy5-Kanal und nicht im Cy3-Kanal sichtbar.

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Die Reaktionsschemata zur Herstellung der nachfolgenden Verbindungen ist in den Figuren 3-7 gezeigt, worauf nachfolgend Bezug genommen wird.

Reagenzien: DMTr-geschützte Nucleoside, 2-Cyanoethyl- N,N,N,N-tetraisopropyl-phosphoro-diamidite und 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphor-imidochloridit von Proligo (Hamburg, Germany). Alle anderen Reagenzien von Fluka (Ulm, Germany)

Beispiel 1: **2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonylchlorid (1)**
Zu 5 ml Diphosgen (41.4 mmol) in 10 ml absolutem THF werden unter Stickstoffatmosphäre bei 0°C über eine Kanüle eine Lösung bestehend aus 7.2 g 2-(2-Nitrophenyl)propanol (39.7 mmol) und 4.4 ml N-Methylmorpholin (39.7 mmol) in 15 ml absolutem THF langsam zugegeben. Nach 1 hr Rühren bei 0°C wird vom gebildeten Niederschlag abgesaugt und das Filtrat am Hochvakuum abgezogen. Man erhält 6.91g von 1 in Form eines braunen Öls (71 %).

Beispiel 2: **N³-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-N-methyl-imidazoliumchlorid (2)**
1.07 ml 2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonylchlorid (1) (4.4 mmol) werden langsam zu einer Lösung von 1.24 ml N-Methylimidazol (14.7 mmol) in 40 ml Dichloromethan über Molsieb 4Å bei 0°C zugetropft. Nach 30 min Rühren im Eisbad wird diese Lösung direkt mit 1.2 Äquivalenten der 5'-O-geschützten Nucleosidbausteine zur Acylierung eingesetzt werden.

Beispiel 3: **1 - M e t h y l - 3 - [2 - (2 - n i t r o p h e n y l) p r o p o x y c a r b o n y l] - i m i d a z o l i u m t r i f l a t (2a)**
Unter Stickstoffatmosphäre werden 2.19 g N,N-Carbonyldiimidazol (13.5 mmol) in 40 ml absolutem Dichlormethan und 10 ml absolutem Nitromethan gelöst und auf 0°C gekühlt. Es werden 3 ml Trifluormethansulfonsäuremethylester (27 mmol) zugegeben und bei 0°C gerührt. Nach 30 min wird eine Lösung bestehend aus 1.22 g 2-(2-Nitrophenyl)propanol (6.75 mmol) in 10 ml absolutem Dichlormethan zugegeben. Die Reaktionslösung kann nach 1 hr Reaktionszeit direkt mit 1.2 Äquivalenten der 5'-O-geschützten Nucleosidbausteine zur Acylierung eingesetzt werden.

Beispiel 4: N4-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)- 5'-O-(4,4'-dimethoxy-trityl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]-2'-deoxycytidin (8)

Zu 1.2 equiv N³-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-N-methylimidazolium chlorid (2) (3.7 mmol) in 50 ml Dichlormethan über Molsieb 4Å werden innerhalb 10 min eine Lösung aus 2.27 g N4-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-desoxycytidin (4) (3.1 mmol) in 20 ml Dichlormethan bei 0°C zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 0°C gerührt, dann mit gesättigter NaHCO₃ (100 ml) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und evaporiert. Reinigung über Flash Chromatographie (0-66 % Ethylacetat in Toluol) ergab 2.12 g (74%) der Titelverbindung.

¹H-NMR (DMSO) : δ 10.90 (br, NH), 8.04 (2d, H-C(6)), 7.80 (m, 1H o zu NO₂), 7.67 (m, 1H m zu NO₂, 1H p zu NO₂), 7.47 (m, 1H m zu NO₂), 7.19-7.34 (m, 9H DMTr, 2Hm zu ^{tert}butyl), 6.99 (2d, H-C(5)), 6.84 (m, 4 H DMTr, 2H o zu ^{tert}butyl), 6.07 (m, H-C(1')), 5.10 (m, H-C(3')), 4.77 (s, CH₂O), 4.14-4.35 (m, OCH₂CH, H-C(4')), 3.70 (m, 2 OCH₃), 3.51 (m, CHCH₃), 3.20-3.30 (m, 2 H-C(5')), 2.51 (m, H-C(2')), 2.31 (m, H-C(2')), 1.28 (d, CHCH₃), 1.24 (s, C(CH₃)₃). HRMS (FAB, M+H⁺) berechnet für C₅₂H₅₄N₄O₁₂ : 927.3816. Gefunden: 927.3826. ESI-MS: 927 (M+H⁺), 950 (M+Na⁺). R_f (Toluol/Ethylacetat 2:1) 0.34

Beispiel 5: N4-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)- 5'-O-(4,4'-dimethoxy-trityl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]-2'-deoxycytidin (8)

Zu 1.2 equiv 1-Methyl-3-[2-(2-nitrophenyl)propoxy-carbonyl]imidazoliumtriflat (2a) (2.8 mmol) in 8 ml Dichlormethan und 2 ml Nitromethan über Molsieb 4Å werden innerhalb 10 min eine Lösung aus 1.68 g N4-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-desoxycytidin (4) (2.3 mmol) in 10 ml Dichlormethan bei 0°C zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 0°C gerührt, dann mit gesättigter NaHCO₃ (100 ml) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und evaporiert. Die Aufreinigung der Titelverbindung erfolgt über Flash Chromato-

graphie (0-66 % Ethylacetat in Toluol).

R_f (Toluol/Ethylacetat 2:1) 0.34

Beispiel 6: 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin (11)

Zu 1.2 equiv N³-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-N-methylimidazolium chlorid (2) (4.4 mmol) in 30 ml Dichlormethan über Molsieb 4Å werden innerhalb 10 min eine Lösung aus 2 g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin (3) (3.67 mmol) in 20 ml Dichlormethan bei 0°C zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 0°C gerührt, dann mit 0.5 % HCl (100 ml) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und evaporiert. Zur organischen Phase wird 10 % Trichloressigsäure (70 ml) in Dichlormethan zugefügt und für 2 min gerührt. Danach wird die tief rote Lösung zweimal mit gesättigter NaHCO₃ (100 ml) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und evaporiert. Reinigung über Flash Chromatographie (0-10 % Methanol in Toluol/Ethylacetat (5:4)) ergab 1.53 g (93%) der Titelverbindung.

¹H-NMR (DMSO) : δ_{11.26} (br, NH), 7.82 (m, 1H o zu NO₂), 7.69 (m, H-C(6), 1H m zu NO₂, 1H p zu NO₂), 7.49 (m, 1H m zu NO₂), 6.11 (m, H-C(1')), 5.09 (m, H-C(3'), HO-C(5')), 4.33 (m, CHCH₂-O), 3.96 (m, H-C(4')), 3.59 (2m, 2 H-C(5')), 3.52 (m, CHCH₂O), 2.24 (m, 2 H-C(2')), 1.77 (2s, CH₃), 1.29 (d, CHCH₃). HRMS (FAB, M+H⁺) berechnet für C₂₀H₂₃N₃O₉ : 450.1512. Gefunden: 450.1-524. ESI-MS: 450 (M+H⁺), 472 (M+Na⁺), 899 (2M+H⁺), 921 (2M+Na⁺). R_f (Toluol/Ethylacetat 1:2) 0.21

Beispiel 7: N4-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxycytidin (12)

Wie beschrieben für 11 mit N4-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-2'-desoxycytidin (4) (5 g, 6.93 mmol) in 50 ml Dichlormethan und 2 (2.71 g, 8.32 mmol) in 50 ml Dichlormethan. Reinigung durch Ausfällen mit Toluol ergab 3.16 g (73%) der Titelverbindung.

¹H-NMR (DMSO) : δ_{10.87} (br, NH), 8.29 (d, H-C(6)), 7.82 (m, 1H

o zu NO₂), 7.69 (m, 1H m zu NO₂, 1H p zu NO₂), 7.48 (m, 1H m zu NO₂), 7.29 (m, 2H m zu ^{tert}butyl), 7.13 (d, H-C(5)), 6.84 (m, 2H o zu ^{tert}butyl), 6.08 (m, H-C(1')), 5.10 (m, H-C(3')), HO-C(5')), 4.77 (s, CH₂O), 4.33 (m, OCH₂CH), 4.10 (m, H-C(4')), 3.62 (m, 2 H-C(5')), 3.53 (m, CHCH₃), 2.48 (m, H-C(2')), 2.21 (m, H-C(2')), 1.29 (d, CHCH₃), 1.24 (s, C(CH₃)₃). HRMS (FAB, M+H⁺) berechnet für C₃₁H₃₆N₄O₁₀: 625.2509. Gefunden: 625.2495. ESI-MS: 625 (M+H⁺), 647 (M+Na⁺), 1249 (2M+H⁺), 1271 (2M+Na⁺). R_f (Toluol/Ethylacetat 1:4) 0.50

Beispiel 8: N6-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxyadenosin (13)

Wie beschrieben für 11 mit N4-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-2'-desoxyadenosin (5) (2.73 g, 3.67 mmol) in 50 ml Dichlormethan und 2 (1.31 g, 4.40 mmol) in 50 ml Dichlormethan. Reinigung über Flash Chromatographie (0-4 % Methanol in Toluol/Ethylacetat (1:1)) ergab 2.05 g (86%) der Titelverbindung. ¹H-NMR (DMSO) : δ_{10.78} (br, NH), 8.66 (m, H-C(2), H-C(8)), 7.83 (m, 1H o zu NO₂), 7.70 (m, 1H m zu NO₂, 1H p zu NO₂), 7.49 (m, 1H m zu NO₂), 7.30 (m, 2H o zu ^{tert}butyl), 6.89 (m, 2H m zu ^{tert}butyl), 6.43 (m, H-C(1')), 5.28 (m, H-C(3')), 5.14 (m, HO-C(5')), 4.98 (s, CH₂O), 4.34 (m, OCH₂CH), 4.12 (m, H-C(4')), 3.60 (m, 2 H-C(5')), CHCH₃), 3.02 (m, H-C(2')), 2.57 (m, H-C(2')), 1.31 (d, CHCH₃), 1.24 (s, C(CH₃)₃). HRMS (FAB, M+H⁺) berechnet für C₃₂H₃₆N₆O₉: 649.2621. Gefunden: 649.2644. ESI-MS: 649 (M+H⁺), 671 (M+Na⁺), 1297 (2M+H⁺), 1319 (2M+Na⁺). R_f (Toluol/Ethylacetat 1:1) 0.17

Beispiel 9: N2-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxyguanosin (14)

Wie beschrieben für 11 mit N2-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-2'-desoxyguanosin (6) (5 g, 6.58 mmol) in 50 ml Dichlormethan und 2 (2.57 g, 7.9 mmol) in 50 ml Dichlormethan. Reinigung über Flash Chromatographie (0-10 % Methanol in Toluol/Ethylacetat

(1:1)) ergab 3.53 g (81%) der Titelverbindung.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO) : δ 11.74 (br, 2 NH), 8.23 (2s, H-C(8)), 7.83 (m, 1H o zu NO_2), 7.70 (m, 1H m zu NO_2 , 1H p zu NO_2), 7.49 (m, 1H m zu NO_2), 7.30 (m, 2H o zu tert -butyl), 6.89 (m, 2H m zu tert -butyl), 6.18 (m, H-C(1')), 5.13 (m, H-C(3')), 5.06 (m, HO-C(5')), 4.81 (2s, CH_2O), 4.34 (m, OCH_2CH), 4.04 (m, H-C(4')), 3.55 (m, 2 H-C(5')), CHCH_3), 2.83 (m, H-C(2')), 2.49 (m, H-C(2')), 1.29 (d, CHCH_3), 1.25 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$). HRMS (FAB, $\text{M}+\text{H}^+$) berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_{10}$: 665.2570. Gefunden: 665.2582. ESI-MS: 665 ($\text{M}+\text{H}^+$), 687 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 1329 ($2\text{M}+\text{H}^+$), 1351 ($2\text{M}+\text{Na}^+$). R_f (Ethylacetat/Methanol 3:1) 0.18

Beispiel 10: 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (15)

Zu einer Lösung aus 1.53 g 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin (11) (3.4 mmol) in 15 ml Acetonitril werden 1.2 ml 2-Cyanoethyl-N,N,N,N-tetraisopropylphosphorodiamidit (3.98 mmol) und 0.5 M Pyridin Hydrochlorid (3.4 ml, 1.7 mmol) in Acetonitril zugefügt. Nach 1 hr Rühren wird die Reaktionslösung mit Dichlormethan (100 ml) verdünnt und mit gesättigter NaHCO_3 (100 ml) extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter NaCl (100 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und evaporiert. Reinigung über Flash Chromatographie (0-30 % Ethylacetat in Toluol) ergab 1.94 g (88%) der Titelverbindung.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO) : δ 11.26 (br, NH), 7.82 (m, 1H o zu NO_2), 7.69 (m, 1H m zu NO_2 , 1H p zu NO_2), 7.47-7.55 (m, H-C(5), 1H m zu NO_2), 6.08 (m, H-C(1')), 5.09 (m, H-C(3')), 4.27-4.35 (m, OCH_2CH_2), 4.12 (m, H-C(4')), 3.70-3.83 (m, 2 H-C(5'), $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.49-3.59 (m, 3 CHCH_3), 2.75 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 2.29 (m, 2 H-C(2')), 1.78 (m, CH_3), 1.28 (d, CH_3), 1.09-1.24 (m, 7 CH_3). $^{31}\text{P-NMR}$ (DMSO) : δ 149.36, 149.33, 149.29
ESI-MS: 649 ($\text{M}+\text{H}^+$), 672 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 1321 ($2\text{M}+\text{Na}^+$). HRMS (FAB, $\text{M}+\text{H}^+$) berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}$: 650.2590. Gefunden: 650.2576. R_f (Toluol/Ethylacetat 1:1) 0.37

Beispiel 11: N4-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxycytidin-5'-O-[(2-cyano-ethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (16)

Wie beschrieben für 15, mit N4-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxy-carbonyl]-2'-desoxycytidin (12) (1.51 g, 2.41 mmol), 2-Cyanoethyl- N,N,N,N-tetraisopropylphosphordiamidit (0.9 ml, 2.84 mmol) und 0.5 M Pyridin Hydrochlorid (2.6 ml, 1.3 mmol). Reinigung über Flash Chromatographie (0-30 % Ethylacetat in Toluol) ergab 1.61 g (81%) der Titelverbindung.

¹H-NMR (DMSO) : δ 10.90 (br, NH), 8.14 (m, H-C(6)), 7.82 (m, 1H o zu NO₂), 7.69 (m, 1H m zu NO₂, 1H p zu NO₂), 7.48 (m, 1H m zu NO₂), 7.29 (m, 2H o zu ^{tert}butyl), 7.14 (m, H-C(5)), 6.83 (m, 2H m zu ^{tert}butyl), 6.07 (m, H-C(1')), 5.10 (m, H-C(3')), 4.77 (s, OCH₂), 4.30 (m, OCH₂CH₂, H-C(4')), 3.75 (m, 2 H-C(5'), OCH₂CH₂CN), 3.55 (m, 3 CHCH₃), 2.73 (m, CH₂CH₂CN), 2.55 (m, H-C(2')-), 2.25 (m, H-C(2')), 1.29 (m, CH₃), 1.15 (m, 7 CH₃). ³¹P-NMR (DMSO) : δ 149.35. HRMS (FAB, M+H⁺) berechnet für C₄₀H₅₃N₆O₁₁P: 825.3587. Gefunden: 825.3568. ESI-MS: 825 (M+H⁺), 847 (M+Na⁺), 1649 (2M+H⁺), 1671 (2M+Na⁺). R_f (Toluol/Ethylacetat 1:1) 0.43

Beispiel 12: N6-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxyadenosin-5'-O-[(2-cyano-ethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (17)

Wie beschrieben für 15, mit N6-((4-^{tert}butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]-2'-desoxyadenosin (13) (1.90 g, 2.93 mmol), 2-Cyanoethyl- N,N,N,N-tetraisopropylphosphordiamidit (1.2 ml, 3.78 mmol) und 0.5 M Pyridin Hydrochlorid (2.9 ml, 1.45 mmol). Reinigung über Flash Chromatographie (0-30 % Ethylacetat in Toluol) ergab 1.9 g (65%) der Titelverbindung.

¹H-NMR (DMSO) : δ 11.70 (br, NH), 8.64 (m, H-C(2), H-C(8)), 7.83 (m, 1H o zu NO₂), 7.71 (m, 1H m zu NO₂, 1H p zu NO₂), 7.48 (m, 1H m zu NO₂), 7.29 (m, 2H o zu ^{tert}butyl), 6.88 (m, 2H m zu

*tert*butyl), 6.45 (m, H-C(1')), 5.33 (m, H-C(3')), 4.98 (s, OCH₂-), 4.36 (m, OCH₂CH₂), 4.24 (m, H-C(4')), 4.78 (m, 2 H-C(5')), OCH₂CH₂CN), 3.53 (m, 3 CHCH₃), 3.12 (m, H-C(2')), 2.74 (m, CH₂CH₂CN-), 2.60 (m, H-C(2')), 1.30 (d, CH₃), 1.11 (m, 7 CH₃). ³¹P-NMR (DMSO) : δ_{149.24}, 149.20, 149.16. HRMS (FAB, M+H⁺) berechnet für C₄₁H₅₃N₈O₁₀P: 849.3700. Gefunden: 849.3723. ESI-MS: 849 (M+H⁺), 871 (M+Na⁺), 1697 (2M+H⁺), 1719 (2M+Na⁺). R_f (Toluol/Ethylacetat 1:1) 0.53

Beispiel 13: N2-((4-*tert*butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)-propoxycarbonyl]-2'-desoxyguanosin-5'-O-[(2-cyano-ethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (18)

Wie beschrieben für 15, mit N2-((4-*tert*butylphenoxy)acetyl)-3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxy-carbonyl]-2'-desoxyguanosin (14) (1.0 g, 1.50 mmol), 2-Cyanoethyl- N,N,N,N-tetraisopropylphosphordiamidit (0.9 ml, 2.84 mmol) und 0.5 M Pyridin Hydrochlorid (1.75 ml, 0.87 mmol). Reinigung über Flash Chromatographie (33-66 % Aceton in Petrolether) ergab 1.19 g (91%) der Titelverbindung.

¹H-NMR (DMSO) : δ_{11.45} (br, 2 NH), 8.15 (m, H-C(8)), 7.83 (m, 1H o zu NO₂), 7.70 (m, 1H m zu NO₂, 1H p zu NO₂, 7.49 (m, 1H m zu NO₂), 7.29 (m, 2H o zu *tert*butyl), 6.88 (m, 2H m zu *tert*butyl), 6.19 (m, H-C(1')), 5.23 (m, H-C(3')), 4.79 (m, OCH₂), 4.36 (m, OCH₂CH₂), 4.20 (m, H-C(4')), 3.73 (m, 2 H-C(5')), OCH₂CH₂CN), 3.55 (m, 3 CHCH₃), 2.87 (m, CH₂CH₂CN), 2.76 (m, H-C(2')-), 2.57 (m, H-C(2')), 1.30 (d, CH₃), 1.15 (m, 7 CH₃). ³¹P-NMR (DMSO) : δ_{149.46}, 149.41. HRMS (FAB, M+H⁺) berechnet für C₄₁H₅₃N₈O₁₁P: 865.3649. Gefunden: 865.3660. ESI-MS: 865 (M+H⁺), 887 (M+Na⁺), 1751 (2M+Na⁺). R_f (Toluol/Ethylacetat/Methanol 5:4:1) 0.39

Beispiel 14: N-Methyl-N3-[(6-nitroveratryl)oxycarbonyl]-imidazoliumchlorid (19)

Bei 0°C werden zu 1.44 ml N-Methylimidazol (18.1 mmol) und

Molekularsieb 4Å in 100 ml absolutem Dichlormethan 2 g Chlormeisensäure-6-nitroveratrylester (7.25 mmol; Firma Fluka Ulm) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 15 Minuten bei 0°C gerührt. Diese Reaktionslösung wird direkt für Acylierungen eingesetzt.

Beispiel 15: 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-thymidin
(21)

Eine Lösung von 1.97 g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin (3.62 mmol) in 18 ml absolutem Dichlormethan und 2 ml absolutem Pyridin werden unter Stickstoffatmosphäre und unter Ausschluss von Licht zu einer N-Methyl-N3-[(6-nitroveratryl)oxycarbonyl]-imidazoliumchlorid-Acylierungsreaktion (19) (hergestellt aus 7.25 mmol Chlorameisensäure-6-nitroveratrylester) zugefügt. Das Reaktionsgemisch wird abgedunkelt über Nacht bei 4°C gerührt. Das Molekularsieb wird abgetrennt und die organische Phase zweimal gegen gesättigte NaHCO₃ (100 ml) extrahiert. Nach Trocknen über Na₂SO₄ werden der organischen Phase 200 ml einer 10 % Trichloressigsäure in Dichlorethan zugefügt und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Die stark rot gefärbte Lösung wird zweimal mit gesättigter NaHCO₃ (200 ml) extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und evaporiert. Reinigung über Flash Chromatographie (66-80% Ethylacetat in Toluol) ergab 1.153 g der Titelverbindung (66 % Ausbeute).

Beispiel 16: 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-
thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopro-
pylphosphoramidit] (22)

Unter Stickstoffatmosphäre werden 1g 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-thymidin (**21**) (2.08 mmol) in 20 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Es werden unter Stickstoffatmosphäre und unter Ausschluss von Licht 0.22 ml N-Methylmorpholin (2 mmol) und 0.24 ml 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphor-imidochloridit (1.1 mmol) zugefügt. Nach 1 hr Rühren wird gegen

gesättigte NaHCO_3 (200 ml), dann gegen gesättigte NaCl (200 ml) extrahiert, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und evaporiert. Reinigung über Flash Chromatographie (50-66% Ethylacetat in Toluol), ergab 0.74 g der Titelverbindung (55 % Ausbeute).

Beispiel 17: Herstellung von DAN-Chips mit Hilfe von monomeren Bausteinen vom Typ 3'-O-[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]-5'-Phosphoramidit

Die DNA-Chip-Synthese wurde analog dem Verfahren von Fodor et al. (Science 1991, 251, S 767 ff) unter Verwendung von Masken bzw. maskenfrei, wie bereits in den deutschen Patentanmeldungen DE 198 58 440.7 bzw. DE 199 62 803.3 gezeigt, auf einer Glasoberfläche als Träger durchgeführt.

Die Bestrahlung zum Zwecke der Abstraktion der 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-Gruppe wird zweckmäßig unter Zusatz einer Base während der Bestrahlung durchgeführt. Hierbei sei auf die deutsche Patentanmeldung DE 198 58 440.7 verwiesen. Der Reaktionsablauf ist schematisch in Fig. 8 gezeigt. Als monomere Bausteine wurde die erfindungsgemäße Verbindung 3'-O-[(2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl)-thymidin-5'-O[(-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit] eingesetzt. Hierbei sei auf die deutsche Patentanmeldung DE 199 15 867.3 verwiesen. Der angewendete Zyklus und die speziellen Synthesebedingungen sind in der deutschen Patentanmeldung DE 198 58 440.7 gezeigt, worauf hier Bezug genommen wird. Die Ankoppelung des Nucleotidstranges erfolgt über das 5'-Ende an die feste Trägerphase. Somit ist nach beendeter Synthese und abschließender Schutzgruppenabspaltung des 3'-OH-Ende frei verfügbar. Dadurch können Enzymreaktionen, die ein freies 3'-Ende verlangen (Polymerase-Reaktionen, Ligase-Reaktionen, PCR, cDNA-Synthese, Sequenzierungen, ...) an diesen Bio-Chips durchgeführt werden.

In Fig. 9 ist das Fluoreszenz-Image des hergestellten Chips mit $d(T_9)$ nach Hybridisierung mit Cy5-markiertem $d(A_{16})$ zu sehen. Das Muster entspricht der angewendeten Maske, d.h. es

war eine erfolgreiche DNA-Chip-Synthese möglich.

Beispiel 18: Herstellung von DNA-Chips mit Hilfe von monomeren Bausteinen vom Typ 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl-5'-Phosphoramidit

Die DNA-Chip-Synthese wurde analog dem Verfahren von Fodor et al. (Science 1991, 251, S767 ff) unter Verwendung von Masken bzw. maskenfrei, wie bereits in den deutschen Patentanmeldungen DE 198 58 440.7 bzw. DE 199 62 803.3 gezeigt, auf einer Glas-oberfläche als Träger durchgeführt.

Die Bestrahlung zum Zwecke der Abstraktion der 3'-O-(6-Nitroveratryl)-Gruppe wird zweckmäßig ohne Zusatz von Lösungsmitteln, also "trocken" durchgeführt. Als monomerer Baustein wurde die erfindungsgemäße Verbindung 3'-O-[(6-Nitroveratryl)oxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit eingesetzt. Hierbei sei auf die deutsche Patentanmeldung DE 100 03 631.7 verwiesen, worauf hier Bezug genommen wird. Die Ankoppelung des Nucleotidstranges erfolgt über das 5'-Ende an die feste Trägerphase. Somit ist nach beendeter Synthese und abschließender Schutzgruppenabspaltung das 3'-OH-Ende frei verfügbar. Dadurch können Enzymreaktionen, die ein freies 3'-Ende verlangen (Polymerase-Reaktionen, Ligase-Reaktionen, PCR, cDNA-Synthese, Sequenzierungen, ...) an diesen Bio-Chips durchgeführt werden.

In Fig. 10 ist das Fluoreszenz-Image des hergestellten Chips mit d(T₁₀) nach Hybridisierung mit Cy5-markiertem d(A₁₆) zu sehen. Das Muster entspricht der angewendeten Maske, d.h. es war eine erfolgreiche DNA-Chip-Synthese möglich.

Beispiel 19: Durchführung einer Polymerase-Reaktion (Primer Extension) auf einem DNA-Chip, der mit Hilfe monomerer Bausteine vom Typ 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit] hergestellt wurde

Auf den dT₉-DNA-Chip wird für die Durchführung der Enzym-Reaktion eine 25 µl Reaktionskammer (EasiSeal, Hybaid) über den Array fixiert.

1 µl des Templats [d(CTATAGTGAGTCGTATTAAAAAAAAAA), 100 µM] werden in 9,5 µl autoklaviertem Wasser für 5 min bei 95°C denaturiert und nach 3 min auf Eis in die Reaktionskammer gefüllt. Zugegeben werden ferner 12,5 µl des Puffers (20 mM TrisHCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 15 mM DTT), 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und zum Schluß 1 µl des Klenow-Fragments (3'exo+5'exo; 5000 U/ml; New England Biolabs). Nach sorgfältigem Mischen wird die Reaktionskammer verschlossen und die Reaktion über Nacht bei 37°C durchgeführt.

Zur Detektion wird anschließend für 30 sec bei 95°C mit Striping-Buffer (2,5 mM Na₂HPO₄, 0,1 % (v/v) SDS) gewaschen und dann mit 5'-Cy5-dA16 und 5'-Cy3-d(CTATAGTGAGTCGTATT) hybridisiert.

Beispiel 20: Durchführung einer Ligase-Reaktion auf einem DNA-Chip, der mit Hilfe monomerer Bausteine vom Typ 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-thymidin-5'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit] hergestellt wurde

Auf den dT₁₀-DNA-Chip wird für die Durchführung der Enzym-Reaktion eine 25 µl Reaktionskammer (EasiSeal, Hybaid) über den Array fixiert.

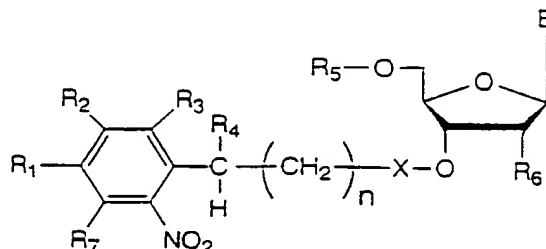
1 µl des Templats [d(CTATAGTGAGTCGTATTAAAAAAAAAA), 100 µM] werden in 17,8 µl autoklaviertem Wasser in die Reaktionskammer eingefüllt. Nach 2 min erfolgt die Zugabe von 1 µl d(5'-Pho-

sphat-AATACGACTCACTATAG) [100 μ M]. Zugegeben werden nach weiteren 2 min ferner 5 μ l des Ligase-Puffers (5x; 250 mM TrisHCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 5 mM ATP, 125 μ g BSA/ml) und zum Schluß 0,2 μ l der T4-DNA-Ligase (400 00 U/ml; New England Biolbas). die Reaktionskammer wird verschlossen und die Reaktion für 1 hr bei 16°C durchgeführt.

Zur Detektion wird anschließend für 30 sec bei 95°C mit Striping-Buffer (2,5 mM Na₂HPO₄, 0,1 % (v/v) SDS) gewaschen und dann mit 5'-Cy5-dA16 und 5'-Cy3-d(CTATAGTGAGTCGTATT) hybridisiert.

Patentansprüche

- 1) Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen der allgemeinen Formel (I)



mit

- R^1 = H, NO_2 , CN, OCH_3 , Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen
- R^2 = H, NO_2 , CN, OCH_3 , Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,
- R^3 = H, Halogen, NO_2 , CN, OCH_3 , Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,
- R^4 = H, Halogen, NO_2 , CN, OCH_3 , Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,
- R^5 = H, Dimethoxytrityl oder eine in der Nucleotidchemie übliche Schutzgruppe oder eine übliche funktionelle Gruppe zur Herstellung von Oligonukleotiden übliche Schutzgruppe
- R^6 = H, OH, Halogen oder ΨR^8 , wobei Ψ = O oder S und R^8 = Alkyl- oder Alkoxyalkyl mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen sowie eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe

$R^7 = H, NO_2, CN, OCH_3, \text{Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 Atomen,}$

$n = 0 \text{ oder } 1$

$X = SO_2, OCO, OCS$

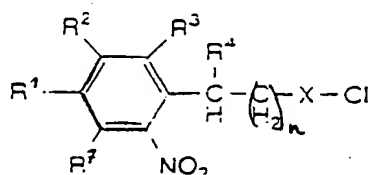
$B = H, \text{Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil, 2,6-Diaminopurin-9-yl, Hypoxanthin-9-yl, 5-Methylcytosin-1-yl, 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäure-1-yl oder 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäureamid-3-yl, wobei im Falle von } B = \text{Adenin, Cytosin oder Guanin die primäre Aminofunktion ggf. eine temporäre oder permanente Schutzgruppe aufweist bzw. Thymin oder Uracil an der O4-Position ggf. eine permanente Schutzgruppe aufweist.}$

- 2) Nucleosid-Derivat nach Anspruch 1, wobei im Falle von $R^4 \neq H$ R^1, R^2 und R^3 jeweils H sind.
- 3) Nucleosid-Derivat nach Anspruch 1, wobei im Fall von $R^2 = OCH_3$ $R^3 = H$ ist.
- 4) Nucleosid-Derivat nach einem der Ansprüche 1-3, wobei $R^4 = CH_3$ ist.
- 5) Nucleosid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die übliche funktionelle Gruppe zur Herstellung von Oligonukleotiden an der Position R^5 eine Phosphitamidgruppe der Formel

$$p\text{-NC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2, p\text{-NC-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2, p\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2 \text{ oder } CH_2=CH\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$$
 ist,

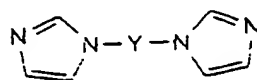
wobei die Q-Gruppen gleich oder verschieden sein können und lineare oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 4 C-Atomen bedeuten.
- 6) Nucleosid-Derivat nach Anspruch 5, wobei die Q-Gruppe Ethyl- oder Isopropyl- ist.

- 7) Nucleosid-Derivat nach einem der Ansprüche 1-6, wobei der Rest R^8 in der Gruppe ΨR^8 an der Position R^6 im Falle von $\Psi = O$ eine O-Alkyl-, O-Alkenyl-, O-Acetal- oder O-Silylether-Gruppe oder im Fall von $\Psi = S$ eine O-Alkyl-Gruppe ist.
- 8) Nucleosid-Derivat nach Anspruch 7, wobei Halogen Cl, Br, I bedeutet.
- 9) Verfahren zur Herstellung von Nucleosid-Derivaten nach einem der Ansprüche 1-8, wobei man
- (a1) eine Verbindung der allgemeinen Formel (II)



in der R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^7 , n und X die oben genannte Bedeutung haben,
mit N-Methylimidazol, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin, Triazol oder Tetrazol umgesetzt, oder

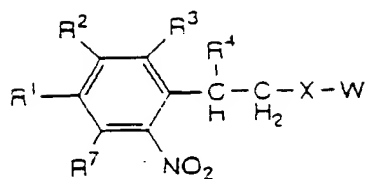
- (a2) eine Verbindung der allgemeinen Formel (V)



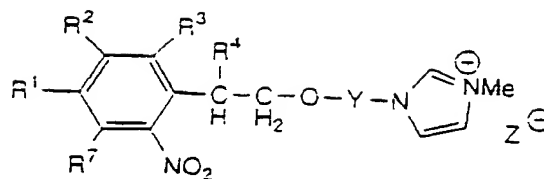
$Y = C=O$ oder $C=S$

mit einem Methylierungsmittel umgesetzt sowie das erhaltene Produkt mit einem Alkohol reagieren läßt und anschließend

- (b) das in Stufe (a1) oder (a2) gebildete Acylierungsreagenz (IV)

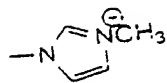


IV (Z=Cl)

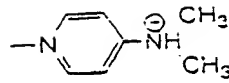
Z[⊖] oder

IV (Z=triflat)

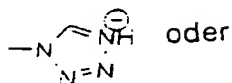
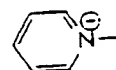
W =



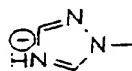
)



)



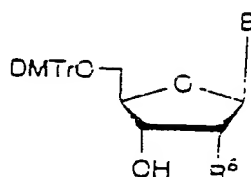
oder



Y =

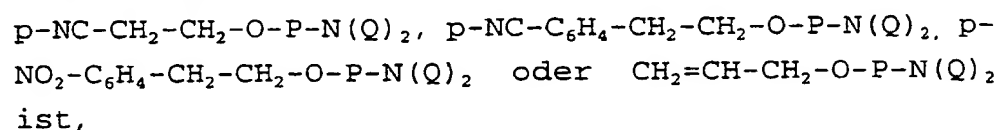
C=O oder C=S

mit einem Nucleosid der allgemeinen Formel (IX)



in der R⁵, R⁶ und B die oben angegebene Bedeutung haben, reagieren läßt.

- 10) Verfahren nach Anspruch 9, wobei man in der 5'-Stellung der entstandenen Nucleosid-Derivate eine Phosphitamid-Gruppe der Formel



wobei die Q-Gruppen gleich oder verschieden sein können

und lineare oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 4 C-Atomen bedeuten, einführt.

- 11) Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei man Stufe (a1) oder (a2) in einem polaren organischen Lösungsmittel bei Temperaturen zwischen -10 und +10 °C durchführt.
- 12) Verfahren nach Anspruch 11, wobei das polare Lösungsmittel Dichlormethan ist.
- 13) Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei die Temperatur ca. 0°C beträgt.
- 14) Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, wobei man Stufe (b) in Dichlormethan oder einem Dichlormethan enthaltenden Lösungsmittelgemisch bei Temperaturen von ca. 0°C durchführt.
- 15) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei man in Stufe (b) das in Stufe (a) gebildete Acylierungsmittel in Dichlormethan vorlegt und das Nucleosid zutropft.
- 17) Verwendung der Nucleosid-Derivate nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Aufbau von Oligonukleotiden oder Nukleinsäure-Chips.
- 18) Nukleinsäure-Chip, bei dem die über eine lichtgesteuerte Synthese aufgebauten Oligomeren über das 5'-Ende an die feste Phase gekoppelt sind.
- 19) Verwendung eines Nukleinsäure-Chips gemäß Anspruch 18 für Enzymreaktionen, die von einer freien 3'-Hydroxylgruppe ausgehen.
- 20) Verwendung eines Nukleinsäure-Chips gemäß Anspruch 18 für Festphasen-gestützte Polymerasereaktionen.

- 21) Verwendung eines Nukleinsäure-Chips gemäß Anspruch 18 für Ligasereaktionen.

1/16

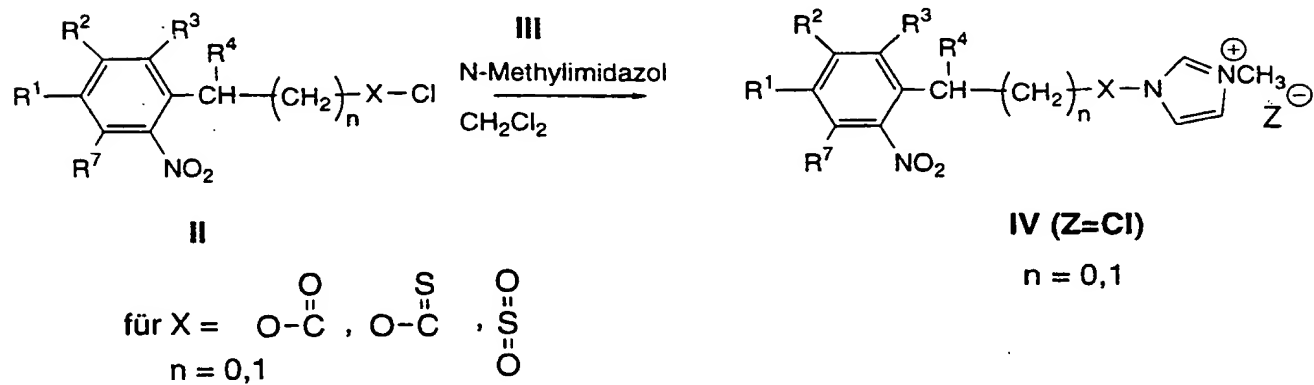
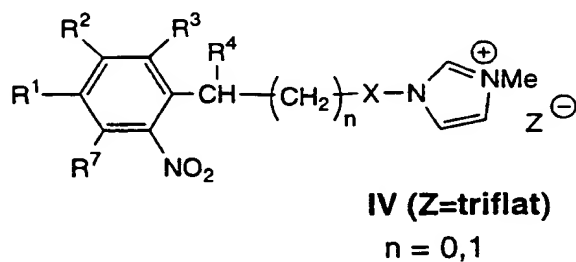
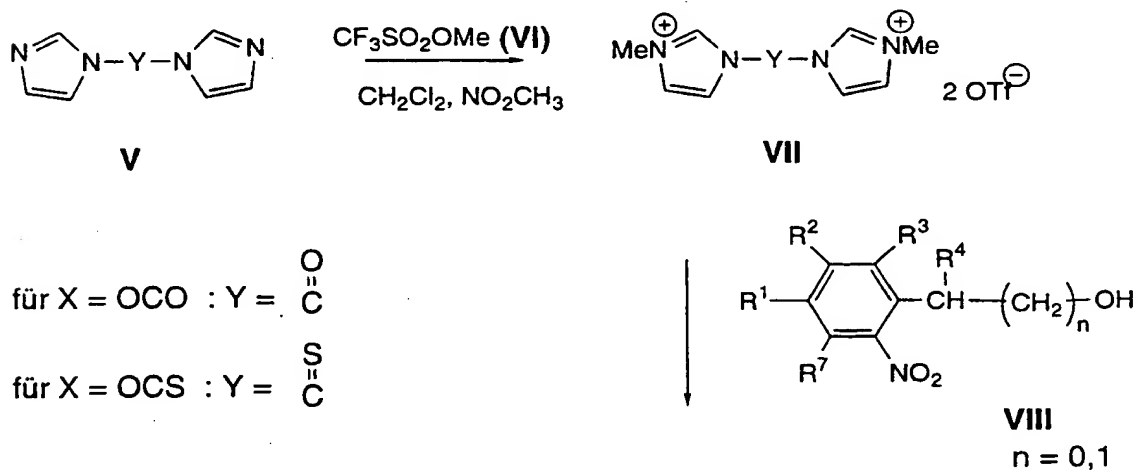
Herstellung des Acylierungsreagenzes für X= SO₂, OCO, OCS:alternativ für X = OCO, OCS:

Fig. 1

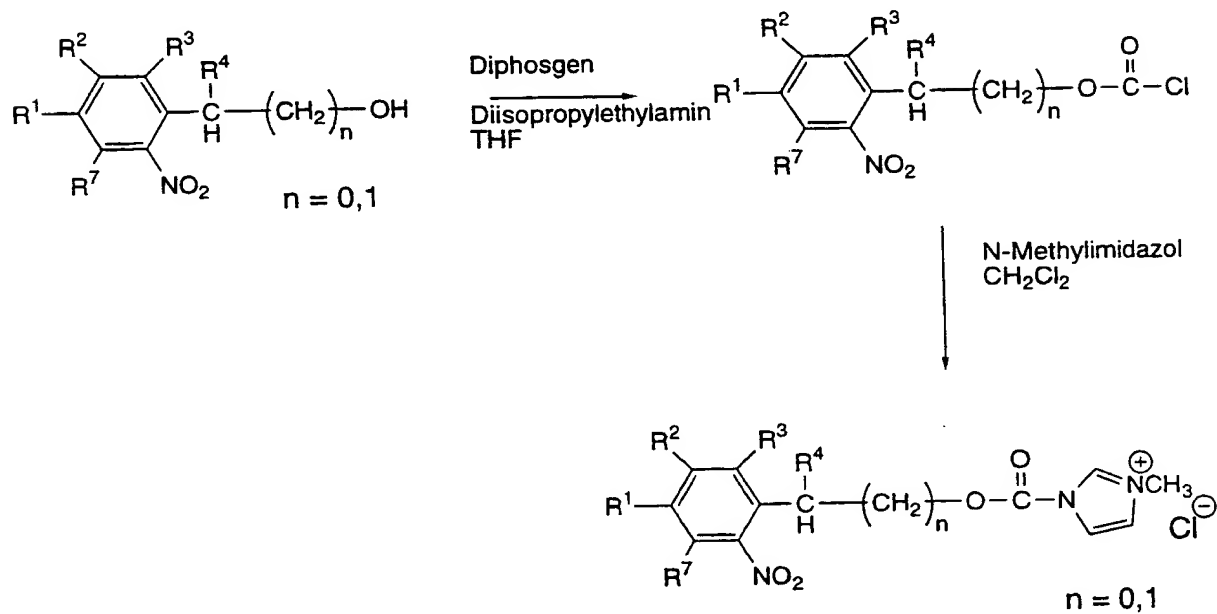
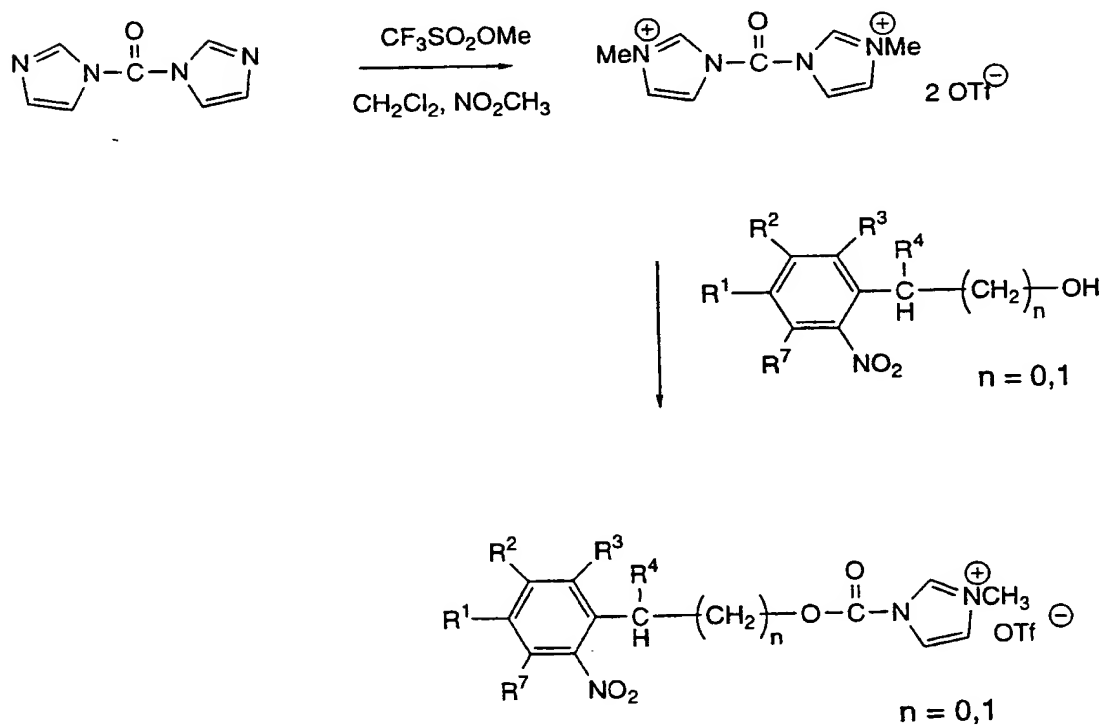
Herstellung des Acylierungsreagenzes für X=OCO :alternativ :

Fig. 1a

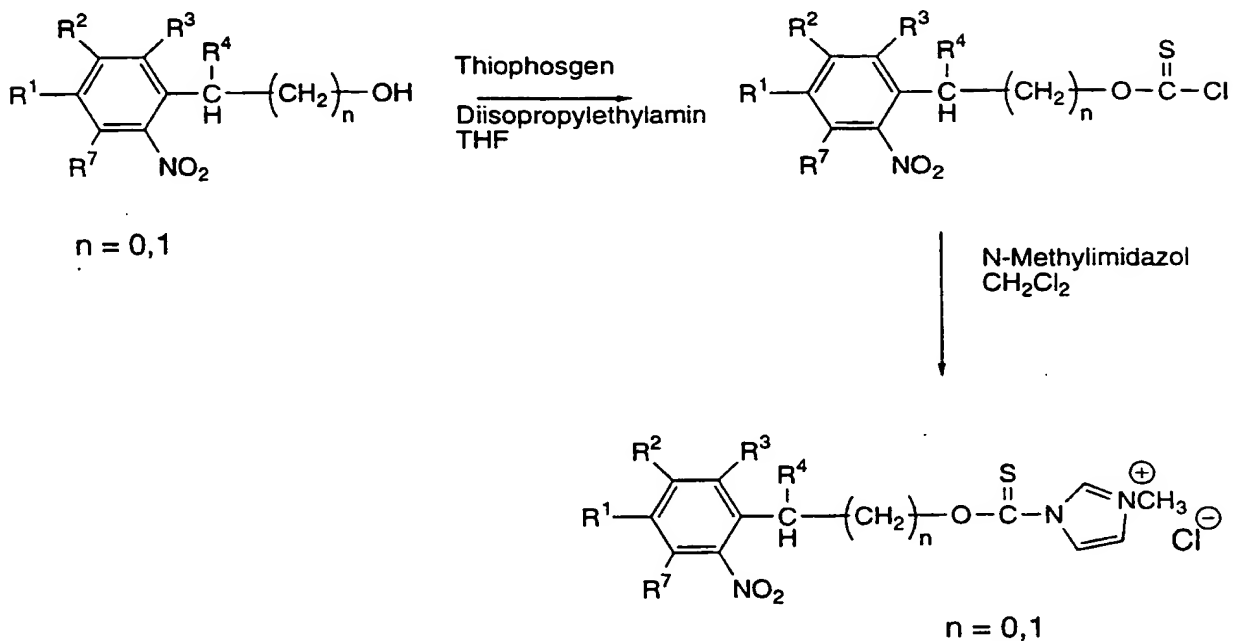
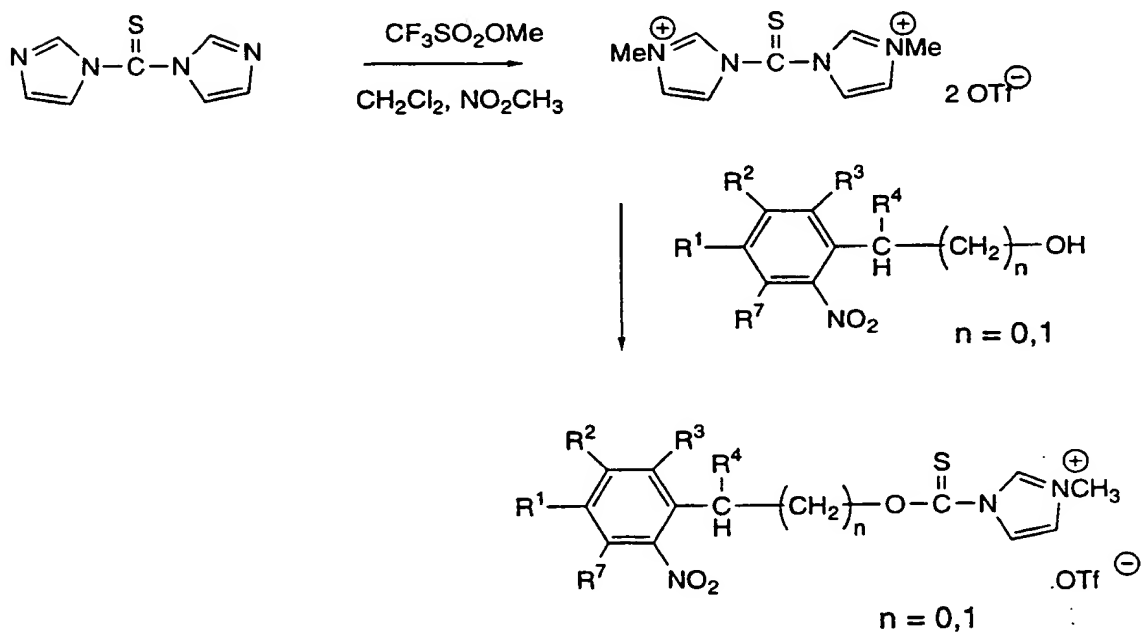
Herstellung des Acylierungsreagenzes für X=OCS :alternativ :

Fig. 1b

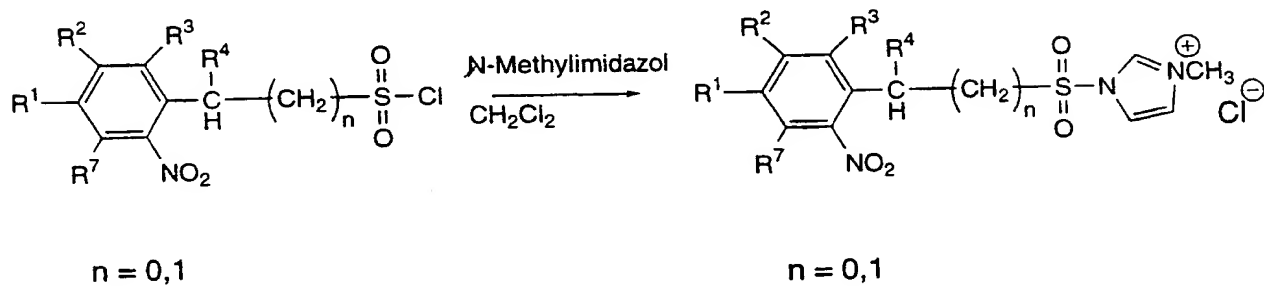
Herstellung des Acylierungsreagenzes für X=SO₂ :

Fig. 1c

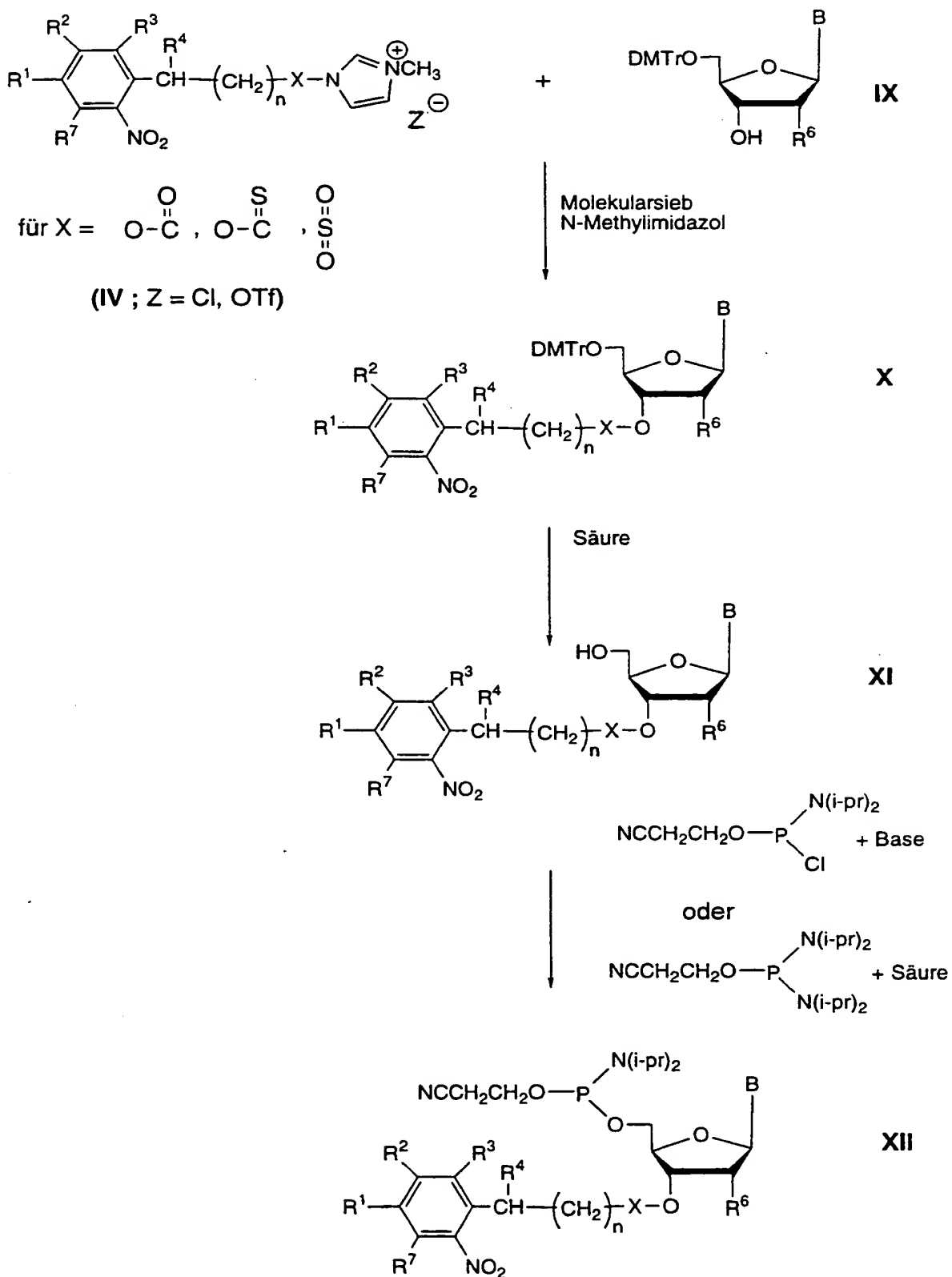
Synthesepan : Umsetzung des Acylierungsreagenzes

Fig. 2

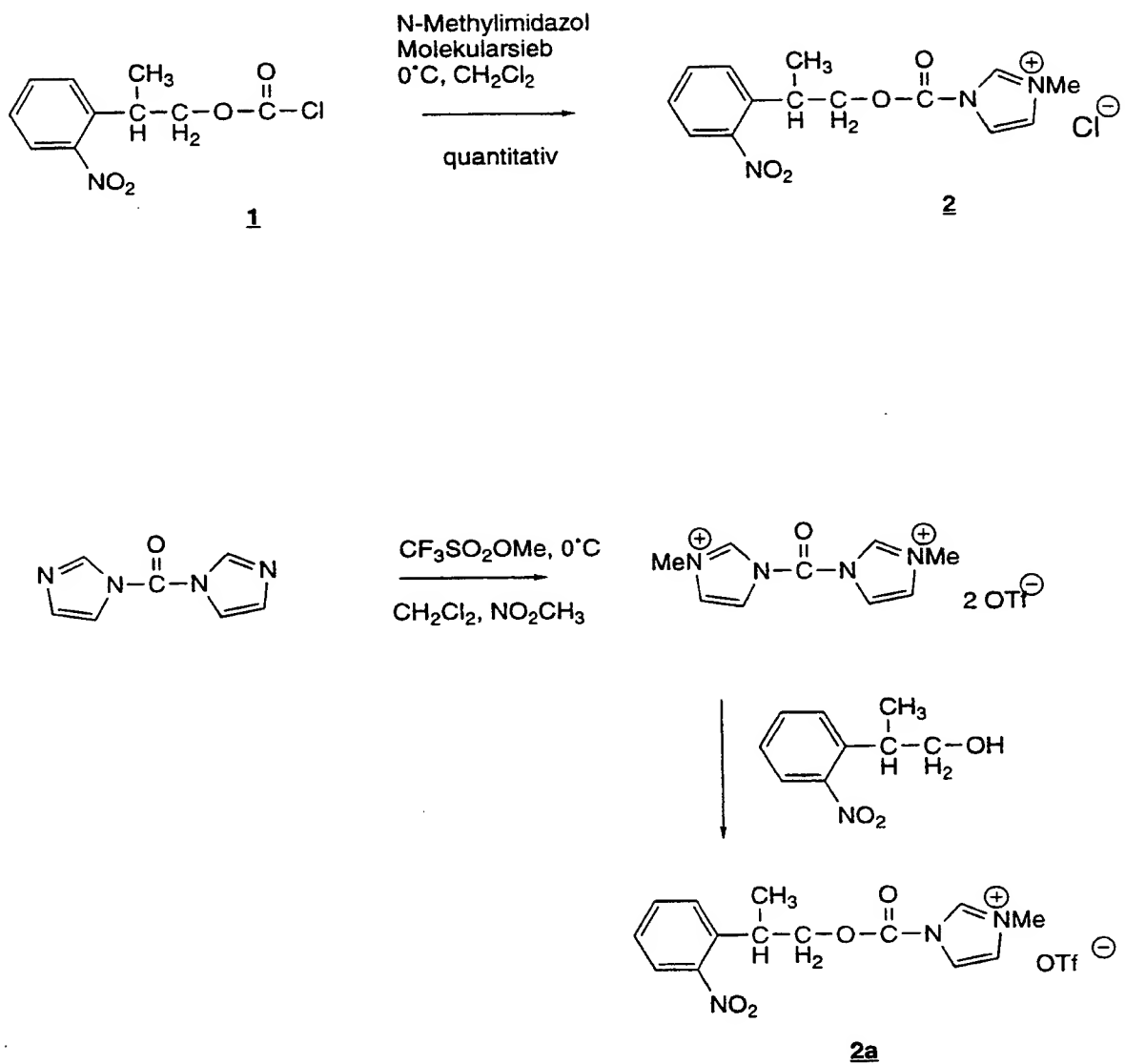
Beispiele :

Fig. 3

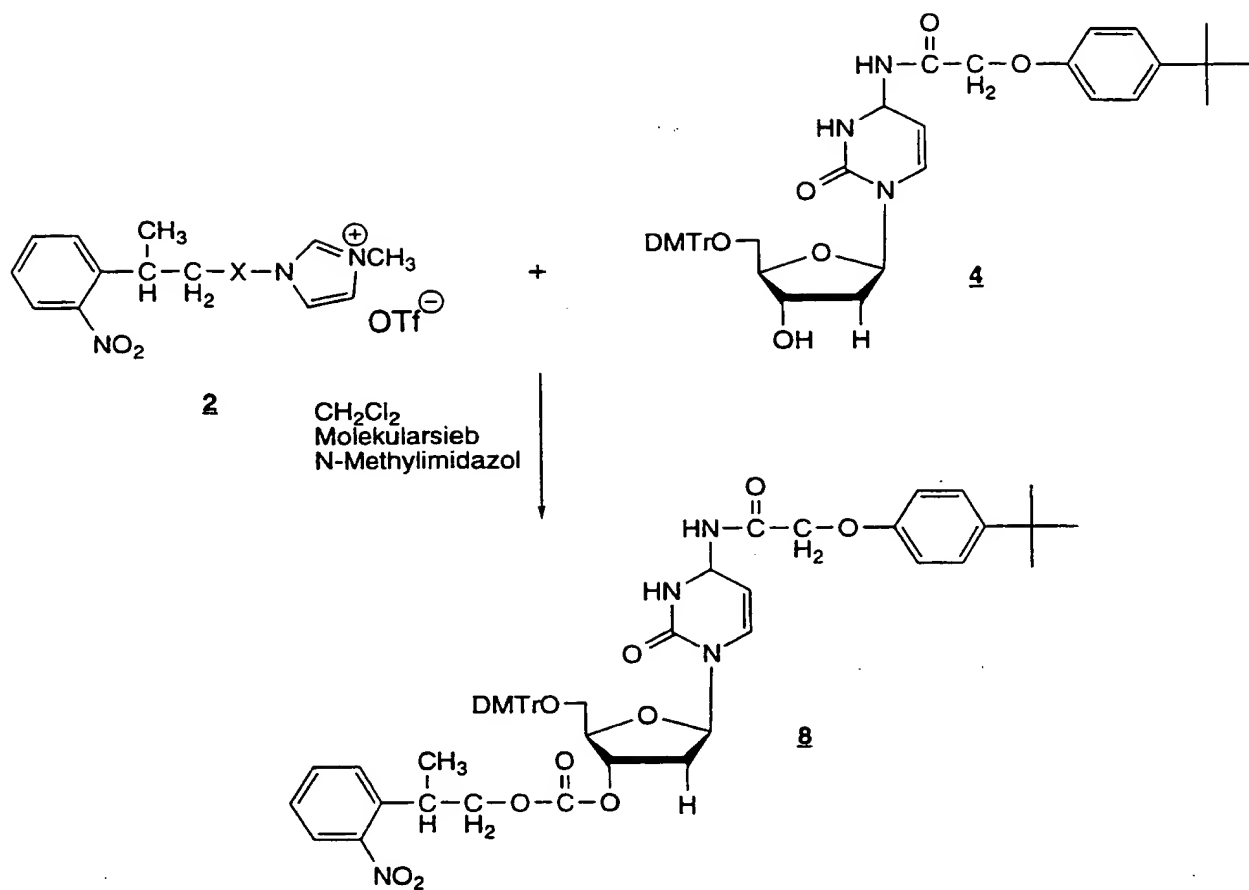
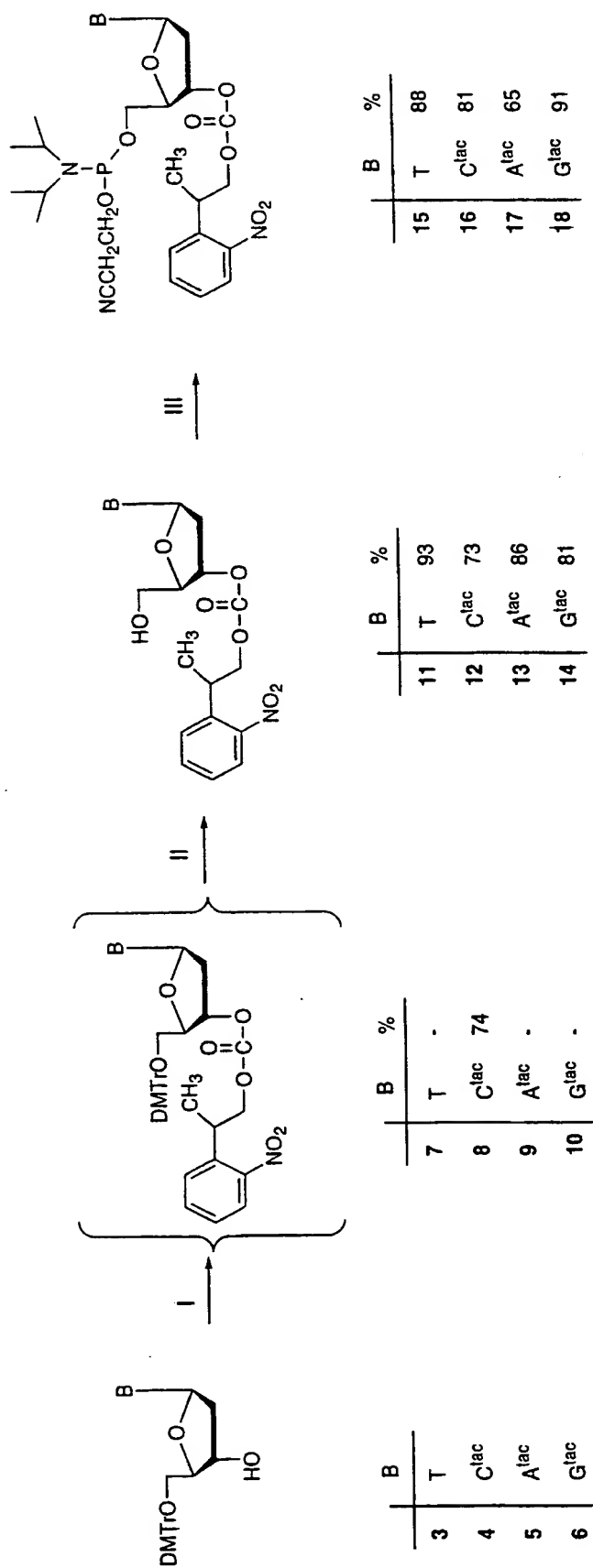
Beispiele

Fig. 4



I : 2, N-Methylimidazol, CH₂Cl₂
 II : Trichloressigsäure, CH₂Cl₂
 III : 2-Cyanoethyl N,N,N,N-tetraisopropylphosphordiamidit, Pyridin Hydrochlorid, Acetonitril

Fig. 5

9/16

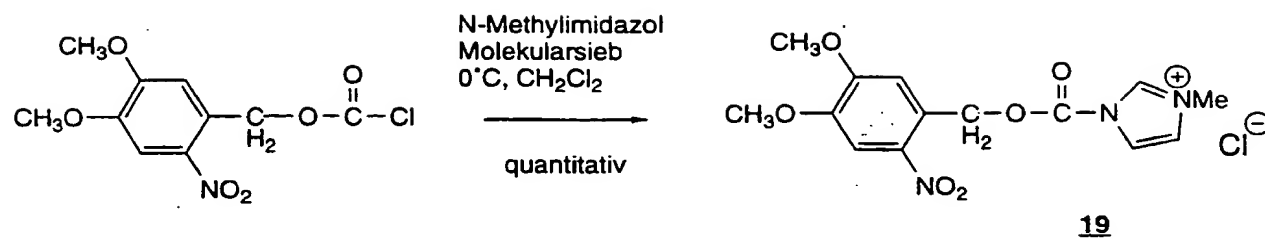
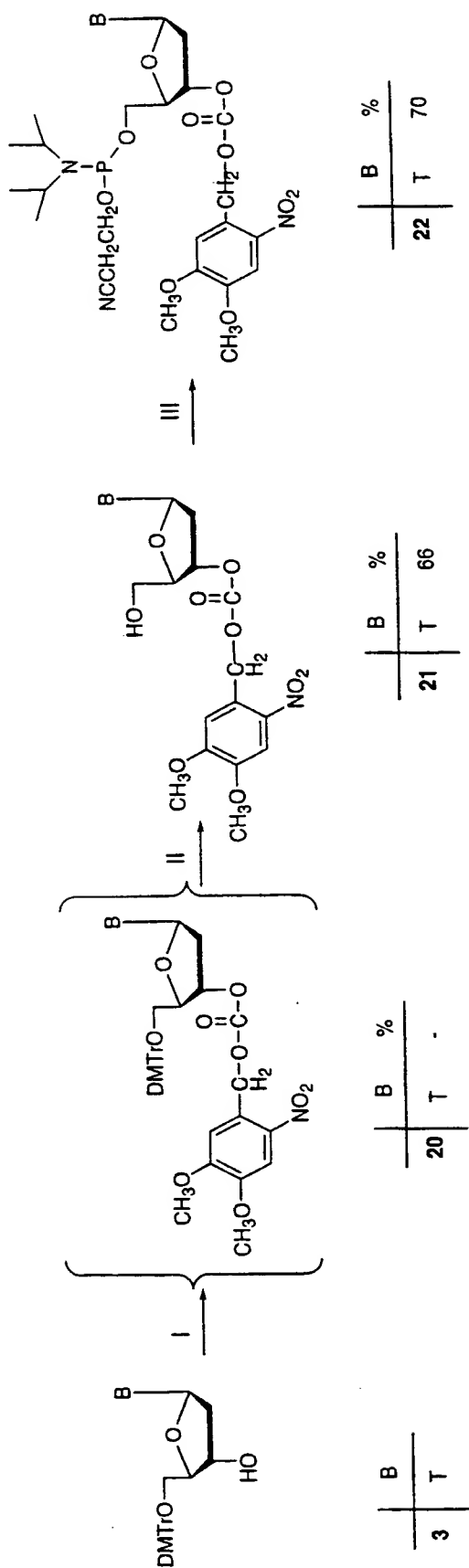
Beispiele :

Fig. 6

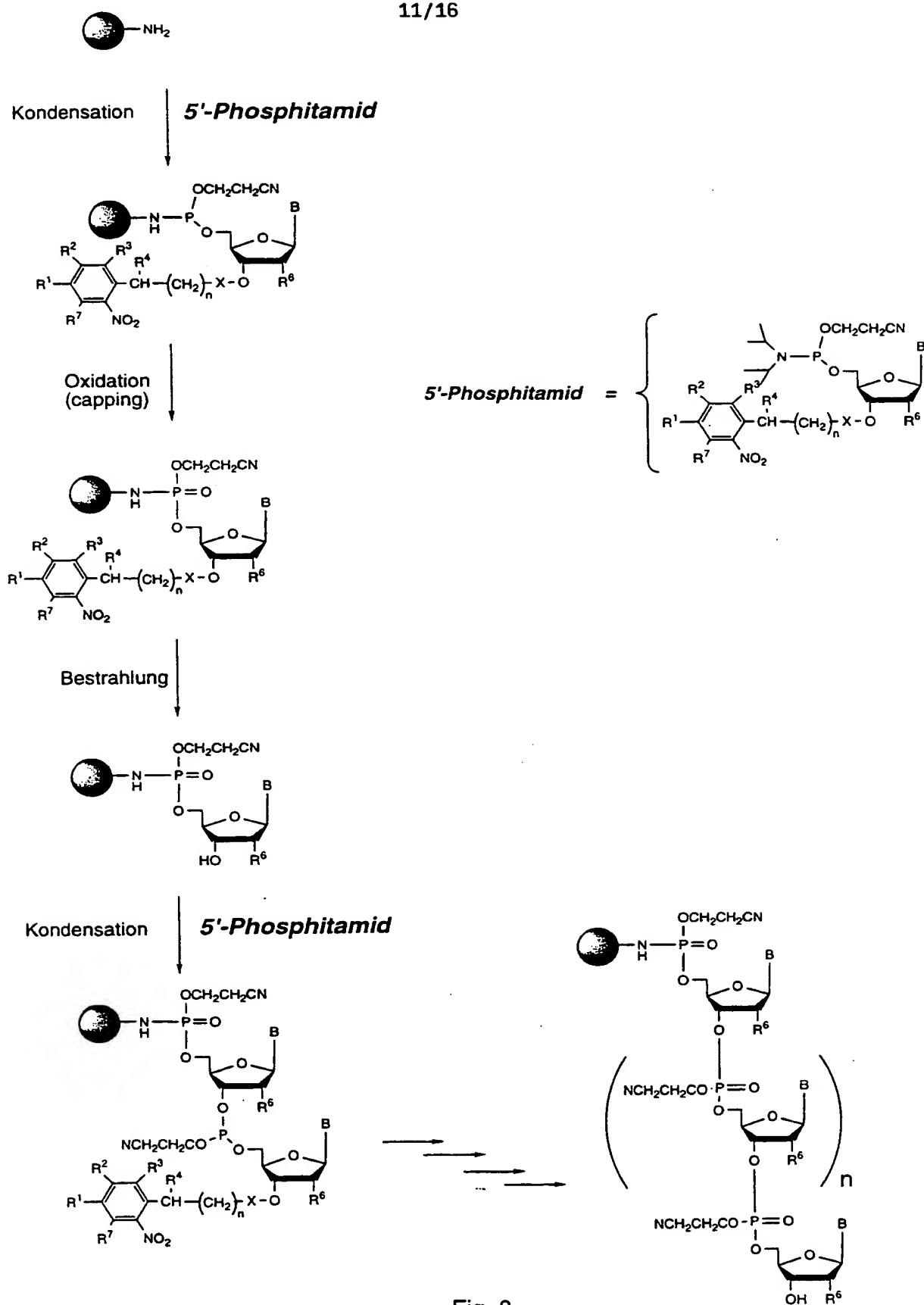
10/16



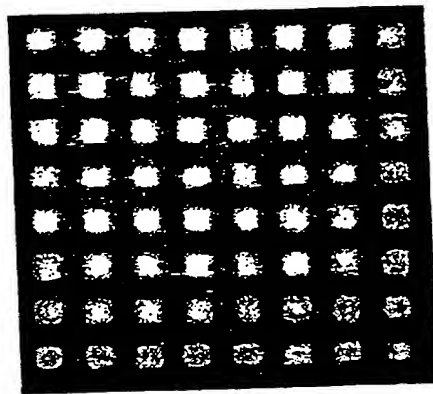
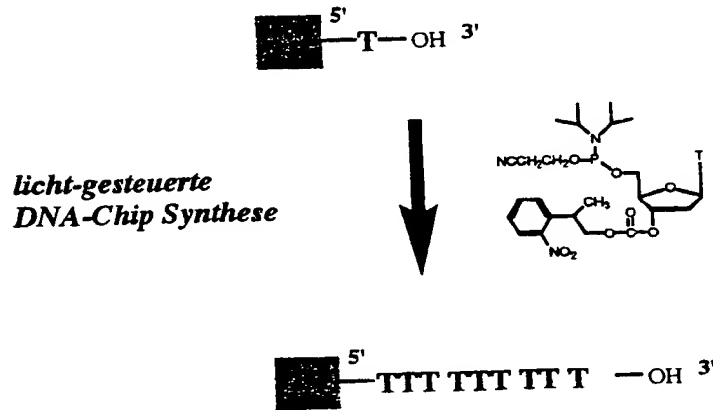
I : 19, N-Methylimidazol, CH_2Cl_2
 II : Trichloressigsäure, CH_2Cl_2
 III : (2-Cyanoethyl)-N,N'-diisopropylphosphor-imidochloridit, Ethyldiisopropylamin, CH_2Cl_2

Fig. 7

11/16



12/16
Synthese von DNA-Chips :

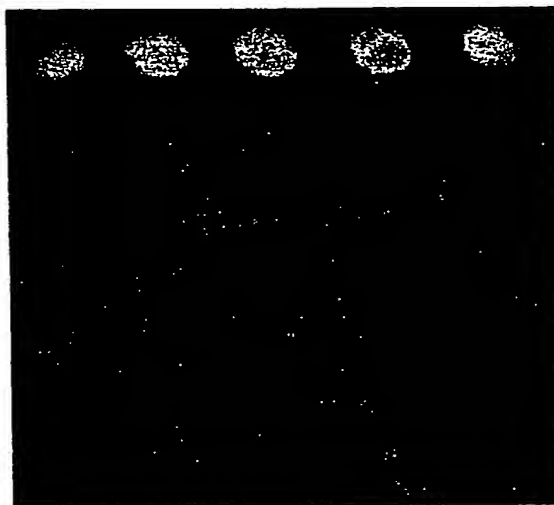
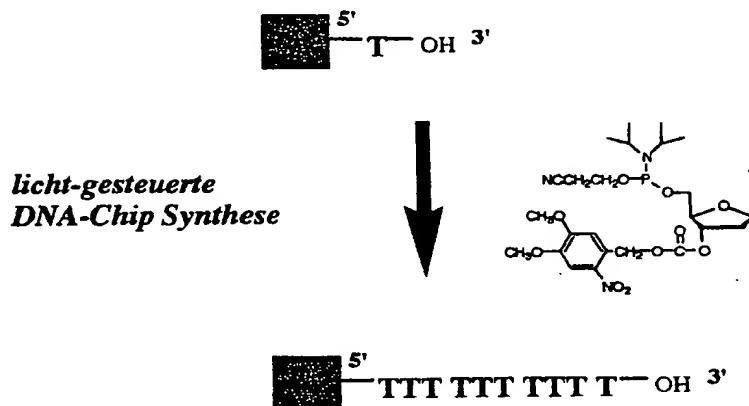


Chip-Synthese

Detektion durch Hybridisierung mit :
 5'-Cy5-d(AAAAAAAAAAAAAAAAAA)

Fig.9

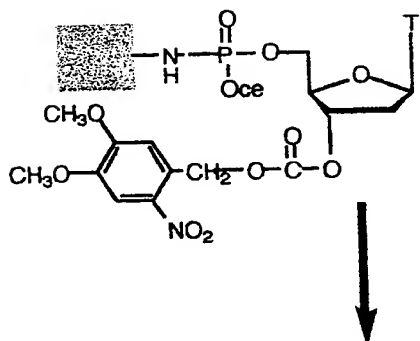
13/16

Synthese von DNA-Chips :**Chip-Synthese**

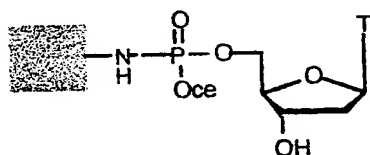
Detektion durch Hybridisierung mit :
5'-Cy5-d(AAAAAAAAAAAAAAAAAA)

Fig.10

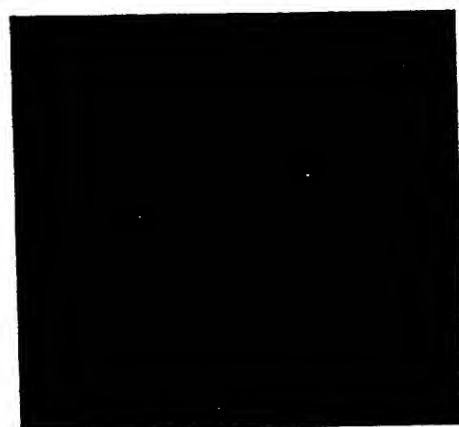
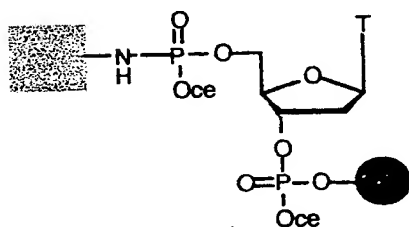
Synthese von DNA-Chips : *Bestimmung der Belichtungszeit*



Belichten (= Abspalten der Photoschutzgruppen)



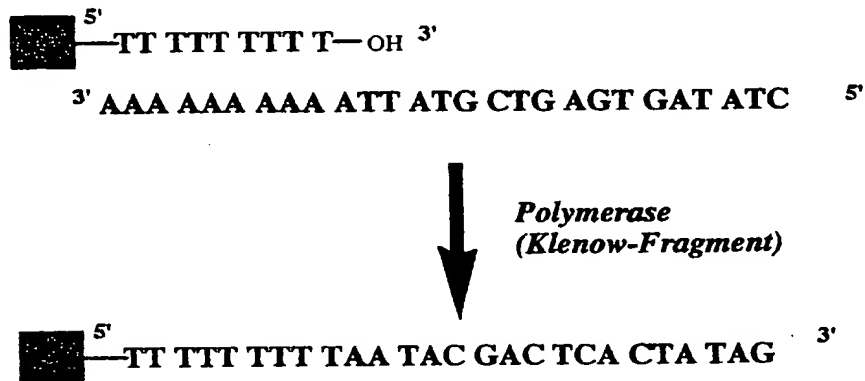
Färben (der abgespaltenen Photoschutzgruppen)



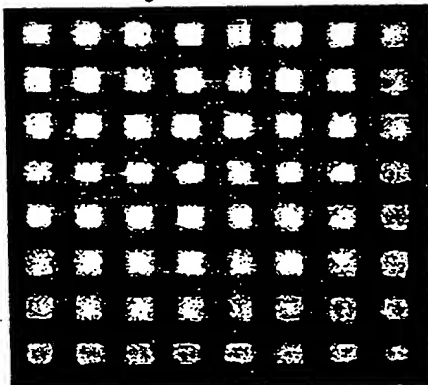
1 5 10 15 20 25 30 35
 {
 Belichtungszeit / min

Fig.11

15/16

Enzymatische Reaktion auf DNA-Chips :***Polymerase*** (Primer Extension)

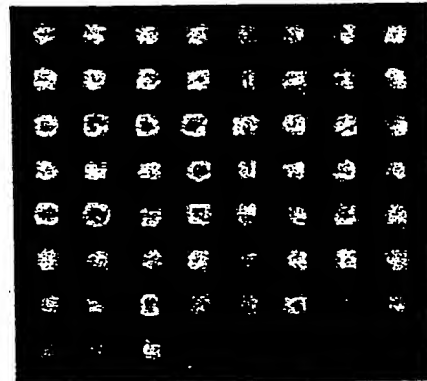
Cy5-Kanal



Chip-Synthese

(a)

Cy3-Kanal



Polymerase

(b)

Detektion durch Hybridisierung mit :

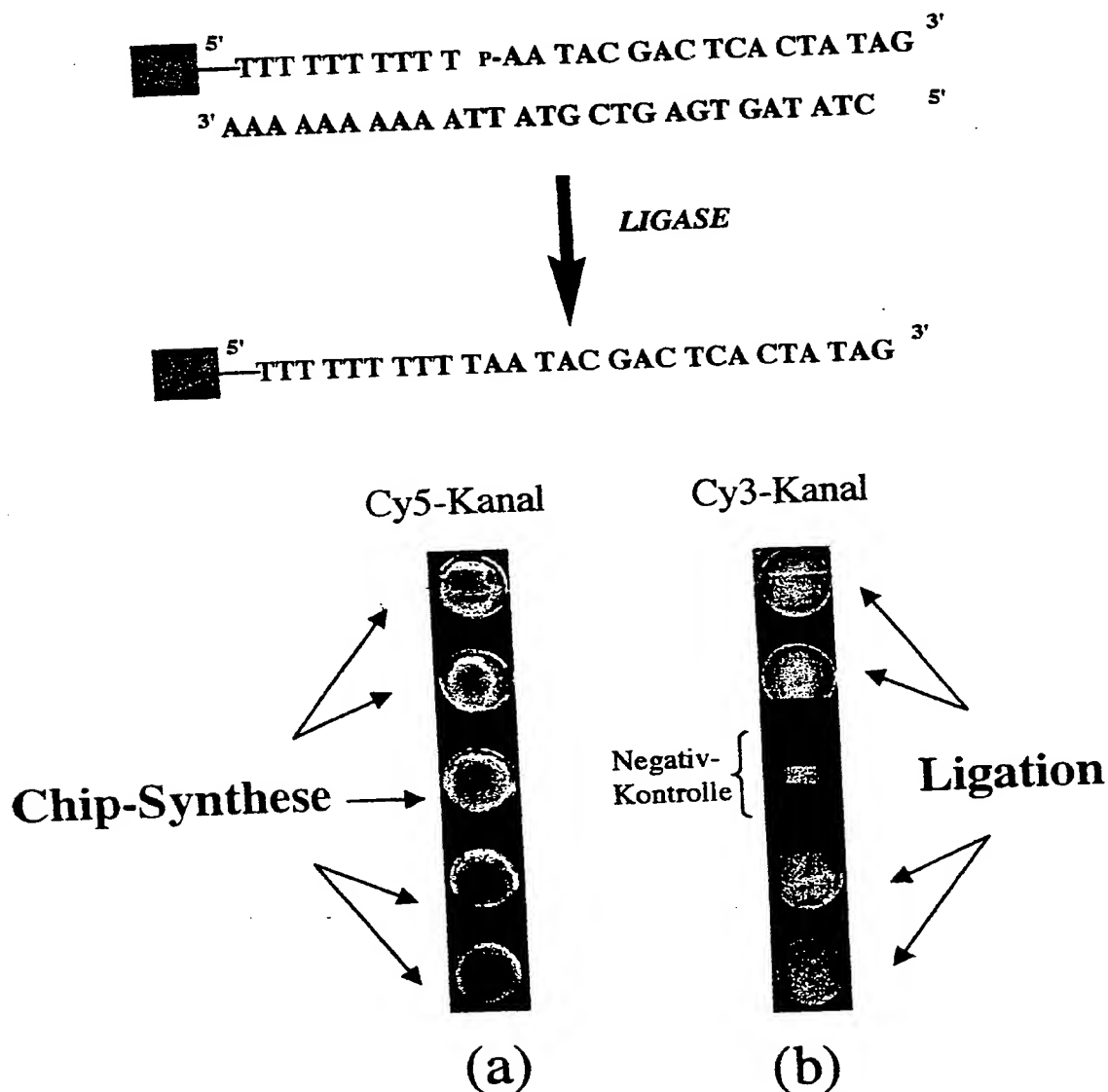
(a) 5'-Cy5-d(AAAAAAAAAAAAAAAAAA)

(b) 5'-Cy3-d(CTATAGTGAGTCGTATTA)

Fig. 12

Enzymatische Reaktion auf DNA-Chips :

Ligase



Detektion durch Hybridisierung mit :

(a) 5'-Cy5-d(AAAAAAAAAAAAAAAAAA)

(b) 5'-Cy3-d(CTATAGTGAGTCGTATTA)

Fig. 13

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. Oktober 2000 (19.10.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/61594 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07H 19/06,
19/16, C12Q 1/68

(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler,
Truderingerstrasse 246, D-81825 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01148

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. April 2000 (07.04.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
199 15 867.3 8. April 1999 (08.04.1999) DE
100 03 631.7 28. Januar 2000 (28.01.2000) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 4. April 2002

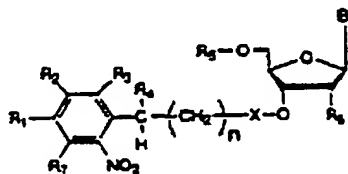
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BEIER, Markus [DE/DE]; Werderstrasse 42a, D-69120 Heidelberg (DE).
HOEISEL, Jörg [DE/DE]; Richard-Wagner-Strasse 2, D-69168 Wiesloch (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NUCLEOSIDE DERIVATIVES WITH PHOTO-UNSTABLE PROTECTIVE GROUPS

(54) Bezeichnung: NUCLEOSID-DERIVATE MIT PHOTOLABILEN SCHUTZGRUPPEN



(1)

(57) Abstract: The present invention relates to nucleoside derivatives with photo-unstable protective groups of general formula (I). The invention further relates to a method for producing said nucleosides, the use thereof and nucleic acid chips consisting thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen der allgemeinen Formel (I). Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung

dieser Nucleoside, deren Verwendung und daraus aufgebaute Nucleinsäure-Chips.

WO 00/61594 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 00 / 01148

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7: C07H19/06 C07H19/16 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7: C07H C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 10128 A (AFFYMAX TECH NV ; HOLMES CHRISTOPHER P (US) ; SOLAS DENNIS W (US) ; K) 11 May 1994 (11.05.94) claims 30 and 33	1-8
A	WO 99 05315 A (DENSAM DANIEL HENRY ; MEDICAL BIOSYSTEMS LTD (GB)) 4 February 1999 (04.02.99) figure 3	1
A	US 5 763 599 A (PFLEIDERER WOLFGANG ET AL) 9 June 1998 (09.06.98) Abstract	1, 17



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 September 2000 (26.09.00)

Date of mailing of the international search report
12 October 2000 (12.10.00)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE 00/01148

Patent document Cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9410128	A	11-05-1994	AU	5449094 A	24-05-1994
WO 9905315	A	04-02-1999	AU	8455998 A	16-02-1999
			EP	1017848 A	12-07-2000
US 5763599	A	09-06-1998	DE	4444996 A	20-06-1996
			AU	692658 B	11-06-1998
			AU	4386596 A	03-07-1996
			BR	9510498 A	30-11-1999
			CA	2207912 A	20-06-1996
			CZ	9701836 A	17-12-1997
			WO	9618634 A	20-06-1996
			EP	0797580 A	01-10-1997
			FI	973643 A	09-09-1997
			HU	77176 A, B	02-03-1998
			JP	11501287 T	02-02-1999
			NO	972754 A	11-08-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01148

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07H19/06 C07H19/16 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07H C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 10128 A (AFFYMAX TECH NV ;HOLMES CHRISTOPHER P (US); SOLAS DENNIS W (US); K) 11. Mai 1994 (1994-05-11) claims 30 and 33 ---	1-8
A	WO 99 05315 A (DENSHAM DANIEL HENRY ;MEDICAL BIOSYSTEMS LTD (GB)) 4. Februar 1999 (1999-02-04) figure 3 ---	1
A	US 5 763 599 A (PFLEIDERER WOLFGANG ET AL) 9. Juni 1998 (1998-06-09) Zusammenfassung -----	1,17

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. September 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/10/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

de Nooy, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01148

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9410128	A	11-05-1994	AU	5449094 A	24-05-1994
WO 9905315	A	04-02-1999	AU	8455998 A	16-02-1999
			EP	1017848 A	12-07-2000
US 5763599	A	09-06-1998	DE	4444996 A	20-06-1996
			AU	692658 B	11-06-1998
			AU	4386596 A	03-07-1996
			BR	9510498 A	30-11-1999
			CA	2207912 A	20-06-1996
			CZ	9701836 A	17-12-1997
			WO	9618634 A	20-06-1996
			EP	0797580 A	01-10-1997
			FI	973643 A	09-09-1997
			HU	77176 A,B	02-03-1998
			JP	11501287 T	02-02-1999
			NO	972754 A	11-08-1997

Formblatt PCT/SA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)